Institut für Neuropsychopharmakologie
der Freien Universität Berlin
Prof. Dr. Helmut Coper

Untersuchungen zur Pharmakologie des ß-Carbolins Harmalan

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Monika Nick
Kerken

Berlin, 1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549615_0040

Institut für Neuropsychopharmakologie
der Freien Universität Berlin
Prof. Dr. Helmut Coper

Untersuchungen zur Pharmakologie des ß-Carbolins Harmalan

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Monika Nick
Kerken

Berlin, 1985

1. Referent: Prof. Dr. H. Rommelspacher

2. Referent: Priv.-Doz. Dr. W. Kehr

3. Referent: Prof. Dr. K. Voigt

Tag der mündlichen Prüfung: 19. 7. 1985

Meinen Eltern,

Hans

Inhalt

Einleitung		1
Material und Methoden		13
1	Versuchstiere	13
2	Substanzen	13
3	Testverfahren	14
3.1	Tierexperimente	14
3.1.1	Auslösung und Beobachtung klonischer Krämpfe	14
3.1.2	Motorik	15
3.2	In Vitro-Experimente	16
3.2.1	Synaptosomenpräparation des Vorderhirns	16
3.2.2	Rezeptor-Bindungsstudien	19
3.2.3	Eiweißbestimmung	20
4	Mathematische Auswertungen	21
4.1	Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung	21
4.2	Logit-Transformation	21
4.3	Analyse nach Scatchard (1949)	22
4.4	Lineare Regressionsanalyse	23
4.5	Transformation: IC_{50} -- K_i-Wert	23
4.6	Berechnung von Konzentrationen aus Zählraten	24
Ergebnisse		25
1	In Vivo-Experimente	25
1.1	Klonische Krämpfe nach Harmalangabe bei naiven Tieren	25
1.2	Vergleich der krampfauslösenden Potenz von Harmalan mit anderen ß-Carbolinen	29
1.3	Klonische Krämpfe nach Harmalangabe nach Vorbehandlung der Tiere mit Diazepam	31
1.4	Klonische Krämpfe nach Tryptamingabe bei mit Pargylin vorbehandelten Tieren	33
1.5	Klonische Krämpfe nach Harmalangabe nach Vorbehandlung der Tiere mit Pargylin und Tryptamin	37
1.6	Motorische Aktivität nach Harmalangabe	46
2	In Vitro-Experimente	48
2.1	Ermittlung der Daten zur spezifischen Bindung von ^{3}H Flunitrazepam	48
2.2	Einfluß von Harmalan auf die spezifische Bindung von ^{3}H Flunitrazepam	52
Diskussion		56
Zusammenfassung		66
Literatur		68

Einleitung:

Bereits die Eingeborenen der Anden wußten um psychotrope Wirkungen der sog. Harmala-Alkaloide (Sigg et al., 1964), Alkaloide von Peganum harmala bzw. Banisteriopsis caapi (Südamerikanische Weinrebe) (Pennes u. Hoch, 1957; Schultes und Hofmann, 1980). Diese basischen Substanzen, zusammengefaßt unter dem Begriff ß-Carboline, sind chemisch Indolderivate und im Pflanzenreich weit verbreitet. So sind auch bspw. Reserpin und Yohimbin dieser Gruppe zuzuordnen (Cantoni, 1975). Psychotrope Wirkungen von Harmala-Alkaloiden auf den Menschen wurden von Naranjo (1979) beschrieben. Die auffallendsten Charakteristika sind Euphorie, Erregtheit und autistisches Verhalten. Auch werden visuelle Halluzinationen induziert. Halpern (1930) machte in einem Selbstversuch nach Einnahme von 20 mg Harmin die Beobachtung einer ausgeprägten Aggressivität. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, daß z.B. Tetrahydronorharman (THN) die motorische Aktivität verminderte (Rommelspacher et al., 1977; Pannier u. Rommelspacher, 1981). Das Interesse an den Harmala-Alkaloiden wuchs, als mindestens 4 Verbindungen dieser Gruppe, nämlich Harman, 6-OH-THN, Tetrahydroharman und THN im ZNS des Säugers nachgewiesen werden konnten (Honecker u. Rommelspacher, 1978; Rommelspacher et al., 1979; Rommelspacher et al., 1980 a; Shoemaker et al., 1978; Greiner u. Rommelspacher, 1984).

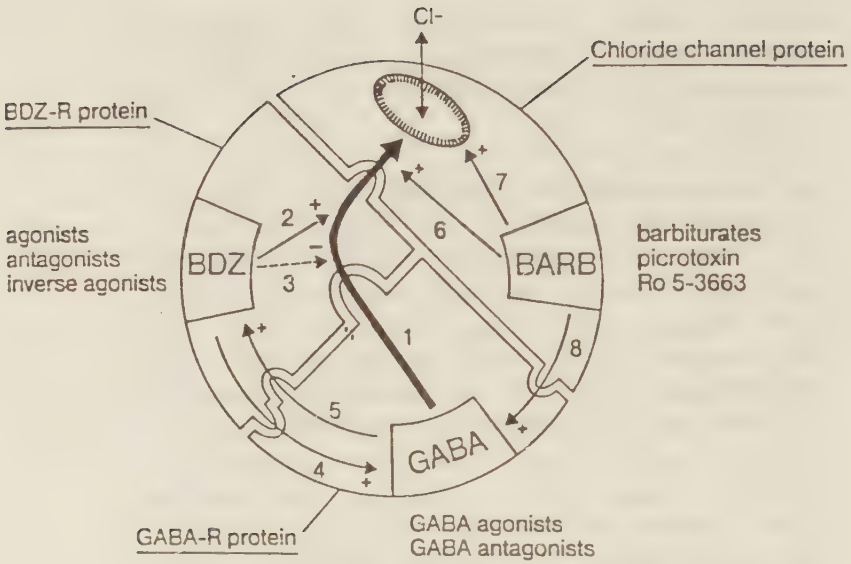
Bei der Suche nach dem zugrundeliegenden Wirkungsmechanismus war der in vitro Befund einer sehr deutlichen Hemmung der spezifischen ^{3}H Flunitrazepam Bindung an Rattenhirn- und Rinderretina-Membranen durch das endogen vorkommende Harman wegweisend (Rommelspacher et al., 1980 b). Beide Gewebe haben Benzodiazepin-Rezeptoren (Braestrup u. Squires, 1978; Borbe et al., 1980).

Diese Beobachtung ist deshalb von großem Interesse, weil die physiologische Funktion des Benzodiazepin-Rezeptors aufgrund der offenen Frage nach dem endogenen Liganden immer noch unklar ist.

Exogene Liganden wie Benzodiazepine wirken über den γ-Aminobuttersäure (GABA)- Benzodiazepin-Rezeptor-Mechanismus (Möhler u. Okada, 1977 a; Squires u. Braestrup, 1977). Bei dieser Wirkung verstärken klassische Benzodiazepine wie bspw. Diazepam mit tranquillisierenden, antikonvulsiven, sedativen und muskelrelaxierenden Eigenschaften den Einfluß des endogenen inhibitorischen Transmitters GABA, indem sie dessen Affinität zu seinem Rezeptor steigern (Costa et al., 1978) oder die Kopplung zwischen diesem Transmitter und einem Chloridkanal in der Membran vermutlich erleichtern. Sie wirken somit als reine Rezeptor-Agonisten (Blanchard et al., 1979) im Gegensatz zu anderen Benzodiazepinen, die z.T. als inverse Agonisten z.T. als Antagonisten angesehen

werden. Diese Dreiteilung der bekannten Benzodiazepine - Agonisten, inverse Agonisten, Antagonisten - wurde von Polc et al. (1982) vorgeschlagen.

Die Agonisten binden an den Benzodiazepin-Rezeptor (Braestrup und Squires, 1977; Möhler und Okada, 1977 b), der als sog. Modulator-Protein in unmittelbarer Nähe zum GABA-Rezeptor liegt. Erst die Interaktion dieses Proteins mit dem GABA-Rezeptor oder einem nachgeschalteten sog. GABA-Effektor führt zu der erwähnten Verstärkung der GABA-Wirkung. Von Polc et al. (1982) wurde ein hypothetisches Modell für den Benzodiazepin-Rezeptor vorgeschlagen, das die Interaktionen dieser Agonisten sowie der inversen Agonisten und der Antagonisten mit diesem Rezeptor erklärt (Schema 1).

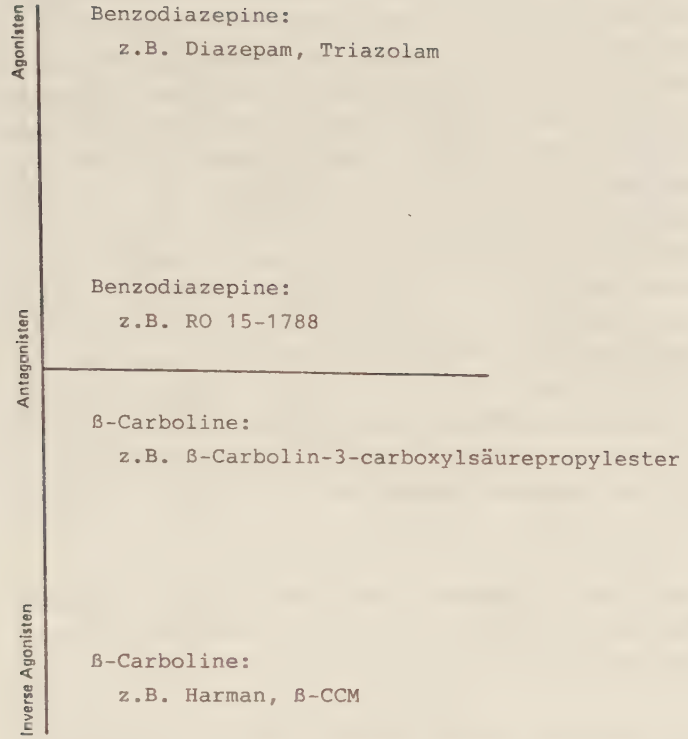


Schema 1: Hypothetisches Modell des GABA-Benzodiazepin-Rezeptor-Chloridkanal-Komplexes von Polc et al. (1982).
Die drei Proteine - GABA-Rezeptor, Benzodiazepin-Rezeptor und Chloridkanal - tragen Bindungsstellen für GABA, Benzodiazepine und Barbiturate. Wird der GABA-Rezeptor aktiviert, kommt es zu einer Öffnung des Chloridkanals (1), wobei der Benzodiazepin-Rezeptor die Rolle einer Kopplungseinheit übernimmt. Agonisten erleichtern (2) und inverse Agonisten schwächen (3) diese Kopplung. Außerdem erhöhen Agonisten die Affinität des GABA-Rezeptors (4), GABA selbst oder GABA-Agonisten die Affinität des Benzodiazepin-Rezeptors (5). Auch Barbiturate steigern den Kopplungsvorgang (6) in Nähe des Chloridkanals, öffnen ihn direkt in hohen Konzentrationen (7) und erhöhen darüberhinaus die Affinität des GABA-Rezeptors (8).

Charakteristisch für solche Agonisten ist, daß sie nicht nur die GABA-Kopplung an den Chloridkanal erleichtern, sondern darüberhinaus auch ihre Affinität zum Bindungsprotein in Gegenwart von GABA erhöht ist (Tallman et al., 1978). Dies gilt in umgekehrter Richtung auch für Antagonisten bzw. die inversen Agonisten am Benzodiazepin-Rezeptor. Der durch Benzodiazepine induzierte shift bzgl. der GABA-Affinität zum GABA-Rezeptor ist also ein Index für das pharmakologische Profil eines Benzodiazepin-Rezeptor-Liganden und erlaubt, einen Benzodiazepin-Agonisten von einem -Antagonisten sowie einen inversen Agonisten in einem in vitro Test abzugrenzen.

Bei Annahme dieses Wirkungsmechanismus wird erklärlich, daß GABA-Antagonisten wie z.B. Bicucullin konvulsiv wirken können. Solche Antagonisten sind in der Tat als konvulsive Substanzen längst bekannt. Eine ähnliche Wirkung sollte man auch von den inversen Agonisten erwarten. So sind Vertreter dieser Gruppe wie verschiedene ß-Carbolinderivate wie Harman (1-Methyl-ß-carbolin), Harmalin, Norharman (ß-Carbolin), Tetrahydronorharman (THN) und der Ethyl- bzw. Methylester der ß-Carboline prokonvulsiv bzw. konvulsiv wirksam (Rommelspacher et al., 1981). Antagonisten wie das gut untersuchte RO 15-1788 und der ß-Carbolin-3-carboxylsäurepropylester (Richards u. Möhler, 1984) haben eine hohe Affinität zum Benzodiazepin-Rezeptormolekül. Sie

haben somit eine große Potenz, Benzodiazepine aus der Bindung an ihren Rezeptor zu verdrängen (Nielsen et al. 1979; Braestrup et al., 1980; Rommelspacher et al., 1980 b), ohne eine Eigenwirkung zu entfalten, und behindern die Bindung von Agonisten oder inversen Agonisten. Ein Konzept der Interaktion dieser verschiedenen Substanzen mit dem Benzodiazepin-Rezeptor ist im Schema 2 dargestellt.



Schema 2: Konzept der Interaktion verschiedener Substanzen mit dem Benzodiazepin-Rezeptor.

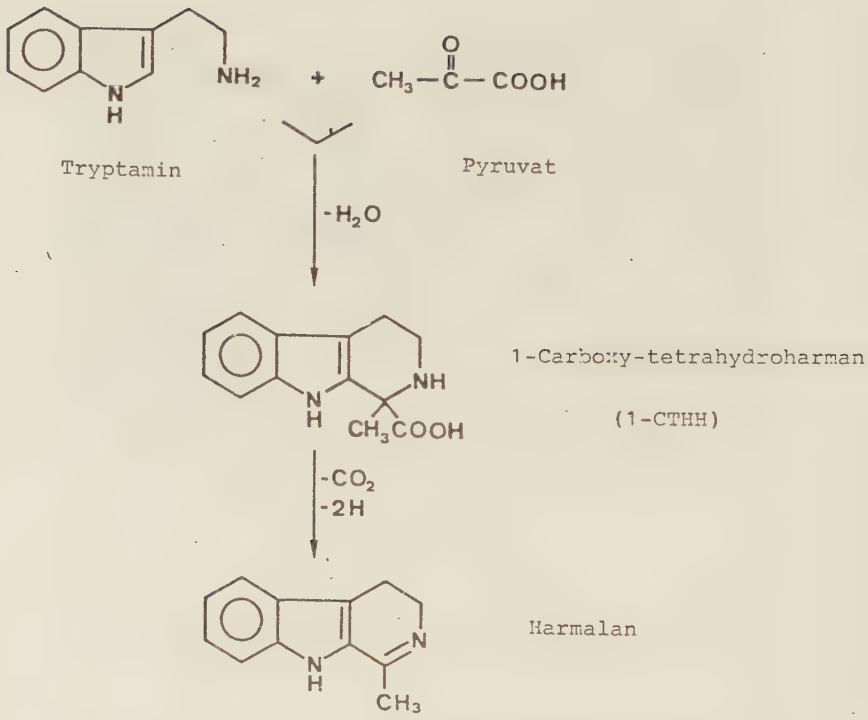
Trotzdem wird bezüglich der Nomenklatur daraufhingewiesen, daß sie zwar die derzeit gängige ist, aber darauf beruht, daß der endogene Ligand sich wie ein Benzodiazepin verhält. Eigene Untersuchungen und die von Costa's Gruppe (Costa et al., 1984) weisen jedoch darauf hin, daß der endogene Ligand eher eine Substanz ist, die der GABA-Wirkung entgegengerichtet ist. Von Rommelspacher und Mitarbeitern (Honecker u. Rommelspacher, 1978; Rommelspacher et al., 1979; Rommelspacher et al., 1980 a; Greiner u. Rommelspacher, 1984) wurden die ß-Carboline in vivo nachgewiesen, von Costa's Gruppe wurde das diazepam-inhibiting-protein (DRI) (Guidotti et al., 1983) entdeckt. Aufgrund dieser Befunde ist an eine andere Nomenklatur zu denken, in der Benzodiazepine Antagonisten sind.

Agonisten verstärken die GABA-Wirkung, inverse Agonisten schwächen sie, und Antagonisten bleiben ohne Einfluß.

Als besonders wirksame Hemmstoffe der spezifischen Benzodiazepin-Bindung haben sich die ß-Carboline Harman und Norharman erwiesen (Braestrup et al., 1980; Rommelspacher et al., 1980 b).Dieser inhibitorischen Potenz bzgl. der Benzodiazepin-Rezeptorbindung in vitro wurde deren konvulsive Wirkung in vivo in einer Arbeit von Rommelspacher et al. (1981) kürzlich gegenübergestellt. Auch hier erwies sich Harman als die konvulsiv wirksamste Sub-

stanz.

Harmalan wurde als ein Zwischenprodukt der Biosynthese des Harmans identifiziert (Susilo, 1984) und müßte physiologischerweise vorhanden sein. Bei der Synthese reagiert Tryptamin mit Pyruvat zu 1-Carboxy-1-methyl-tetrahydroharman (1,2,3,4-Tetrahydro-1-methyl-ß-carbolin-1-carboxyl säure), das leicht zu Harmalan (3,4-Dihydro-1-methyl-ß-carbolin) decarboxyliert und dehydriert wird (Schema 3). Die Dehydrierungsreaktion bleibt allerdings nicht auf der Stufe von Harmalan stehen, sondern führt zu Harman (1-Methyl-ß-carbolin) sowie Tetrahydroharman.



Schema 3: Biosynthese von Harmalan.

Das Syntheseschema verdeutlicht, daß es sich bei den ß-Carbolinen um tricyclische Verbindungen mit Strukturähnlichkeit zu Indolaminen handelt. Diese Tatsache legt Gedanken über einen möglichen Zusammenhang zwischen den Indolalkylaminen, Serotonin (5-HT) und Tryptamin, und den ß-Carbolinen hinsichtlich zentraler Wirkungen nahe.

Sowohl 5-HT als auch Tryptamin sind a) endogen vorkommende und b) im ZNS äußerst wirksame Verbindungen. Feldberg und Sherwood (1954) beobachteten nach Injektion von Serotonin in die Seitenventrikel von Katzen u. a. eine Schwächung der Skelettmuskulatur und katatonieähnliche Zustände. Diese sowie viele andere Effekte des 5-HT dürften Folgen einer Interaktion dieses Indolalkylamins mit dem oder den Serotonin-Rezeptoren sein.

Die Verabreichung von Tryptamin in Gegenwart eines Monaminoxidase (MAO)-Hemmers löst bei Ratten und Meerschweinchen dosisabhängig Krämpfe aus (Tedeschi et al., 1959; Maj et al., 1982; Luscombe et al., 1983).

Für Tryptamin existieren hoch affine Bindungsstellen, wie Kellar und Cascio (1982), Rommelspacher und Brüning (1984) sowie Brüning und Rommelspacher (1984) im Rattenhirn nachweisen konnten, die sich aber von denen für Serotonin unterscheiden. Die biologischen Wirkungen sind

unabhängig von denen des Serotonins (Wooley u. Shaw, 1953; Winter u. Gessner, 1968; Übersicht bei Jones, 1982).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von Tryptamin auf das Verhalten von Ratten geprüft und der Frage nachgegangen, ob das strukturverwandte ß-Carbolin Harmalan die Tryptamin-Wirkung zu beeinflussen vermochte.

Material und Methoden

1 Versuchstiere

Für alle Experimente wurden weibliche Wistar-Ratten (180-220 g) (Fa. Hagemann, Extertal) benutzt. Die Tiere wurden in einem klimatisierten Raum bei 23° C gehalten, 10 pro Käfig, bei freier Wasser- und Futtermenge. Alle Ratten wurden nur einmal in den Versuchen eingesetzt.

2 Substanzen

Diazepam (Hoffmann La Roche, Grenzach); ^{3}H Flunitrazepam, spez. Akt.: 85,3 Ci/mMol (Amersham Buchler, Braunschweig); Szintillationscocktail Biofluor (NEN Chemicals, Dreieich); Pargylin-hydrochlorid (Serva, Heidelberg); Tryptamin-hydrochlorid (Sigma, München); Whatman GF/B Filter (Whatman, Clifton/NJ). Cremophor EL und alle Substanzen zur Herstellung von Pufferlösungen, Lösungsmitteln und Präparationsmedien hatten den p.A. Reinheitsgrad und stammten von der Fa. Merck, Darmstadt. Harmalan wurde von Dr. Susilo, Berlin, in Übereinstimmung mit den Angaben von Späth und Lederer (1930) synthetisiert.

3 Testverfahren

3.1 Tierexperimente

3.1.1 Auslösung und Beobachtung klonischer Krämpfe
Alle hier beschriebenen Experimente wurden in einem ruhigen Raum in der Zeit von 16-19 Uhr durchgeführt. Die Testsubstanz Harmalan wurde in 10% Cremophor EL - NaCl physiol. gelöst und in Dosen von 6,25 - 8,59 - 9,37 - 11,00 - 12,50 mg/kg Körpergewicht (KG) den Ratten in die laterale Schwanzvene injiziert (Vol. je 5 ml/kg KG). Dazu wurden die Ratten zunächst 10 min in Plastikröhren (6 cm ⌀) adaptiert, erhielten dann die Injektion und wurden unmittelbar danach zur Beobachtung in Plexiglaszylindern (40 cm hoch, 30 cm ⌀) auf die Tischplatte gesetzt.

Im Falle einer Diazepam-Vorbehandlung erhielten die Ratten diese Substanz in einer Dosis von 0,7 bzw. 1,4 mg/kg KG i.p. verabreicht (Injektionsvol. 10 ml/kg KG), und erhielten nach 10 min die o.g. Harmalan-Injektion. Diazepam war wie Harmalan in 10% Cremophor EL - NaCl physiol. gelöst.

Zur Beobachtung eines möglichen Tryptamineffektes wurde den Tieren eine Pargylin-Lösung (10 mg/kg KG in 10 ml NaCl physiol.) i.p. injiziert. Nach 60-90 min erhielten die Tiere eine i.p.-Gabe von 40 - 50 - 60 - 75 - 90 mg Tryptamin/kg KG in 10 ml NaCl physiol. gelöst.

Zur Prüfung eines additiven bzw. potenzierenden Effektes von Harmalan auf die Tryptamin-Wirkung erhielten die Tiere nach der schon beschriebenen Pargylin-Vorbehandlung nur eine Tryptamin-Dosis (40 mg/kg KG) und wurden nach einer Adaptationszeit von 10 min mit 6,25 - 3,13 - 2,00 - 1,56 mg Harmalan/kg KG wie oben beschrieben weiterbehandelt.

3.1.2 Motorik

Für die Motilitätsmessung wurde ein Meßgerät mit zentraler Steuerungs- und Registriereinheit eingesetzt. Der Apparat verfügte über 5 parallel angeordnete Platten (jede 54 x 38 cm), die jeweils schachbrettartig in 64 quadratische Felder unterteilt waren und durch einen Polypropylenrahmen (56 x 35 x 19 cm) eingegrenzt waren. Die Felder verfügten über Sensoren, über die durch die Bewegungen der Tiere Impulse ausgelöst wurden. Die Sensoren waren so eingestellt, daß alle Bewegungen, die gröber als Nagen waren, registriert wurden. Diese wurden verstärkt, abgeleitet und pro Zeiteinheit (10 min) aufaddiert und ausgedruckt. Die Bewegungsaktivität von je 2 Ratten wurde 3 h lang registriert.

Die Ratten wurden in Gruppen von 10 Tieren für mindestens 5 Tage in einem klimatisierten, geräuschisolierten Raum gehalten und an Licht-Dunkelphasen von je 12 h adaptiert. Die Adaptationszeit für die Tiere auf den Feldern betrug

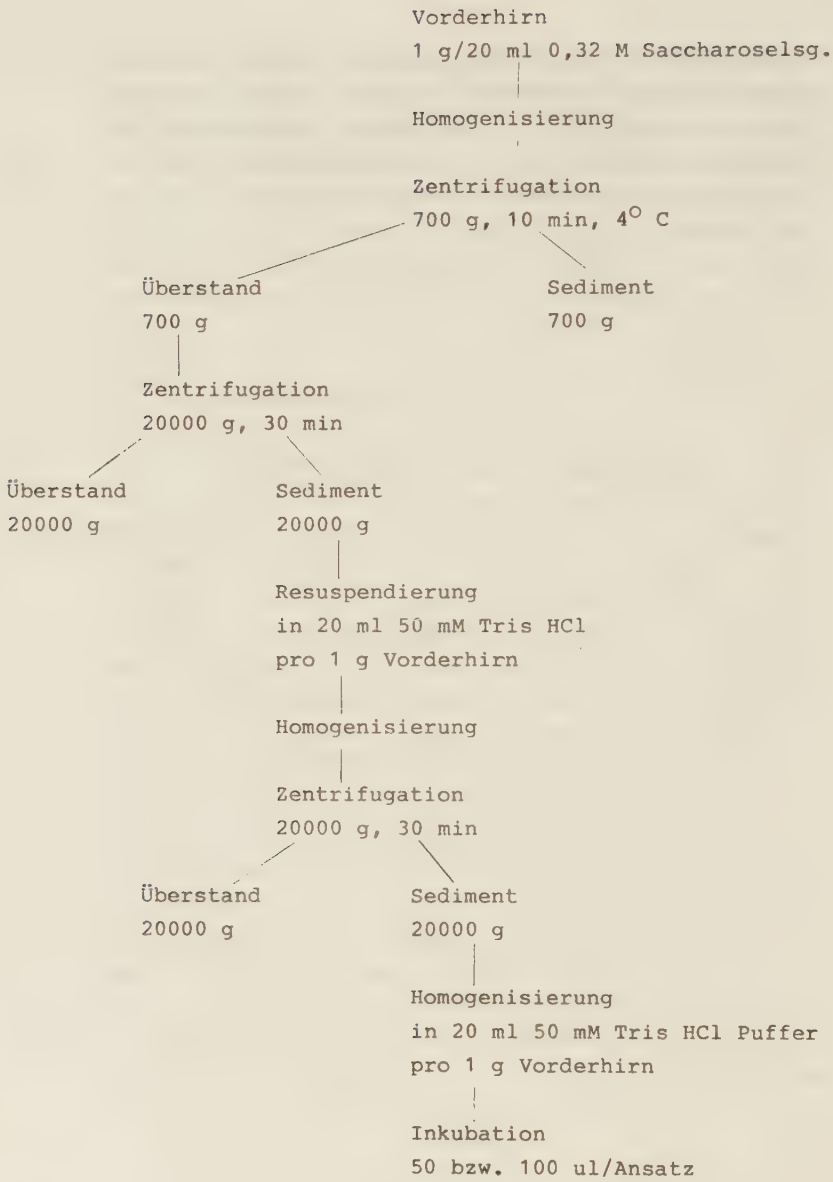
jeweils 24 h, erst danach erfolgte die Injektion des Lösungsmittels bzw. der Testsubstanz. Nach weiteren 10 min erfolgte die Registrierung. Es wurde darauf geachtet, daß die Injektion in der dritten Stunde nach Einsetzen der Dunkelphase erfolgte. Zu diesem Zeitpunkt war ein Plateau der normalen Spontanaktivität erreicht, wie aus früheren Experimenten bekannt war (Fuchs et al., 1983).

3.2 In Vitro-Experimente

3.2.1 Synaptosomenpräparation des Vorderhirns

Das Gehirn einer dekapitierten Wistar-Ratte wurde sofort nach Präparation auf Eis gelegt. Mit einem Skalpell wurde das Vorderhirn caudal der Vierhügelplatte von Teilen des Stammhirns und vom Kleinhirn getrennt und in eiskalter 0,32 M Saccharoselösung (20 ml/g Vorderhirn) im Glas-teflon Homogenisator (Potter-Elvehjem, Fa. Braun, Melsungen) mit 12 Hüben bei 1000 Umdrehungen/min (Upm) homogenisiert. Das Homogenat wurde in einer Zentrifuge (M.S.E. Scientific Instruments Ltd., Sussex, GB) in einem 8 x 50 ml Rotor (Typ 43114-143) 10 min bei 3000 Upm (700 g) bei 4^{o} C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann 30 min bei 16 000 Upm (20 000 g) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 20 ml 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 (bezogen auf 1 g Vorderhirn) erneut mit 12 Hüben bei 1000 Upm homogenisiert und wieder bei 16 000 Upm 30 min

zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Sediment erneut in 20 bzw. 40 ml Tris-HCl-Puffer/1,0 g Vorderhirn homogenisiert (Schema 4). Von dieser Suspension wurden 50 bzw. 100 ul im Inkubationsansatz eingesetzt.



Schema 4: Präparation der Synaptosomen.

3.2.2 Rezeptor-Bindungsstudien

10 ul ^{3}H Flunitrazepam Stammlösung wurden mit 3 ml Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 7,4) verdünnt. Diese Verdünnung entsprach der eingesetzten höchsten Konzentration von 19,08 nM, einer Radioaktivität von $2,4 \times 10^{5}$ cpm bzw. 0,3 uCi/100 ul Inkubationsansatz. Aus dieser Lösung wurde eine Verdünnungsreihe für die Konzentrationen 9,33 - 4,71 - 2,35 - 1,17 - 0,58 nM mit Tris-HCl-Puffer hergestellt.

Im Falle der Inkubation in Gegenwart von Diazepam wurde eine 50 uM Lösung in Tris-HCl-Puffer verwendet. Der Inkubationsansatz von 250 ul enthielt 100 ul der entsprechenden ^{3}H Flunitrazepam Lösung, 50 ul Diazepam-Lösung bzw. Tris-HCl-Puffer, 50 ul Harmalan-Lösung und 50 bzw. 100 ul Gewebesuspension.

Das eigentliche Bindungsexperiment wurde über 40 min bei 0° C durchgeführt. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 5 ml eiskaltem Tris-HCl-Puffer und unmittelbar anschließender Filtration durch einen Whatman GF/B-Filter unter Verwendung eines Millipore Topfes beendet. Der Filter mit dem zurückgehaltenen partikulären Eiweiß wurde 2 x mit je 5 ml eiskaltem Tris-HCl-Puffer gespült. Die Filter wurden in Szintillationsgefäße gegeben, mit 10 ml Biofluor versetzt und in einem Szintillationszähler (Fa. Packard Instrument GmbH, Frankfurt/M.) gemessen. Die Zählausbeute lag bei 39%. Die Proben, die in Gegenwart von 50 uM Diazepam inkubiert wurden, dienten der Ermittlung der unspezifischen Bindung (modifiziert nach Damm et al., 1978).

3.2.3 Eiweißbestimmung (nach Lowry et al. 1951)

Bei der Bestimmung wird das Eiweiß in einen Kupfereiweiß-Komplex überführt. Aromatische Aminosäuren, die in diesem Komplex vorliegen, reduzieren wahrscheinlich die Phosphormolybdänsäure im Folin-Ciocalteus Reagenz zu Molybdänblau.

Das mit 0,4 N Perchlorsäure gefällte und sedimentierte Eiweiß wurde in 4 bzw. 10 ml 0,5 N NaOH 20 min unter Rühren im Wasserbad bei 50° C gelöst und mit Wasser so verdünnt, daß die Eiweißkonzentration im linearen Extinktionsbereich lag, der in Vorversuchen bestimmt worden war. Zu 1 ml dieser Lösung wurden 5 ml eines frisch zubereiteten Gemisches (300 ml 2%ige Natriumcarbonat-Lsg. in 0,1 N NaOH und 6 ml 0,1%ige Kalium-Natriumtartrat-Lsg. in 0,5%iger Kupfer-II-sulfat-Lsg.) pipettiert. Nach 15 min wurde unter Schütteln 0,5 ml 1 N Folin-Ciocalteus-Reagenz zugegeben. Die Extinktion wurde nach 55 min gegen einen Reagenzleerwert (Wasser) in einem Zeiss-Spektralphotometer bei 700 nm gemessen. Die Eiweißkonzentrationen wurden aus einer vorher mit Rinder-Serum-Albumin aufgestellten Eichkurve errechnet. Zur Kontrolle wurden bei jeder Bestimmung Standardlösungen aus 30 und 50 ug Albumin/ml Wasser mitgemessen.

4 Mathematische Auswertungen

4.1 Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung

Sämtliche Meßergebnisse wurden als arithmetische Mittelwerte ($\bar{x}$) mit der Standardabweichung (s) zusammen angegeben.

$\sum(\bar{x}-x)$ = Summe der Abweichungsquadrate (SAQ)

$n-1$ = Anzahl der Freiheitsgrade

n = Anzahl der Meßwerte

4.2 Logit-Transformation

Die beobachteten Effekte (Dosis-Wirkungskurven) wurden einer logit-Transformation unterzogen. Logits sind dabei folgendermaßen definiert:

$z = \log (P/(100 - P))$,

wobei P für den beobachteten Effekt in % steht. Die ED_{50}-Werte wurden den Abbildungen entnommen, nachdem die Mittelwerte der Meßwerte logit transformiert und einer Regressionsanalayse (s.u.) unterzogen worden waren. Die logit-Transformation wurde nach Linder und Berchthold (1976) vorgenommen.

4.3 Analyse nach Scatchard (1949)

Die Bindungsexperimente wurden nach Scatchard (1949) ausgewertet. Dabei wurde davon ausgegangen, daß das eingesetzte Substrat mit einem bindenden Protein im Sinne der allgemeinen Gleichgewichtsreaktion

$$A + P \rightleftharpoons C$$

reagiert. In diese Gleichung gehen die im Gleichgewicht vorliegenden Konzentrationen des reagierenden Moleküls (A), des bindenden Proteins (P) und des Eiweiß-Substrat-Komplexes (C) ein. Die Dissoziationskonstante (K_D) errechnet sich aus:

$$K_D = (A) \times (P)/(C)$$

Das Verhältnis von gebundenem zu freiem Substrat ist

$$(C)/(A)$$

und steht mit der Gesamtprotein-Konzentration ((P)t) durch die Geradengleichung

$$(C)/(A) = -1/K_D \times (C) + (P)t/K_D$$

in Beziehung.

Trägt man das Verhältnis "gebundene/freie Substratkonzentration" gegen die "gebundene Konzentration" auf, erhält man eine Gerade mit der

Neigung

$-1/K_D$

und dem Schnittpunkt auf der Abszisse von

$(P)t/K_D$;

(P)t gibt die Konzentration der Bindungsstellen an.
Die in dem Scatchard-Plot gezeigte Gerade wurde zuvor mit Hilfe der linearen Regressionsanalyse (s. 4.4) berechnet.

4.4 Lineare Regressionsanalyse
In den Fällen, bei denen eine Beziehung zwischen den Parametern x und y bestand, wurden die Meßwerte in das Koordinatensystem eingetragen und eine sog. Regressionsgerade mit diesen Werten berechnet. Die Regressionsgerade wurde nach der Methode der kleinsten Quadrate gezeichnet und gehorchte der Geradengleichung mit dem Steigungsmaß b und dem Ordinatenabschnitt a; ihre Berechnung erfolgte mittels der linearen Regressionsanalyse, wie sie in einschlägigen Statistikbüchern beschrieben ist.

4.5 Transformation: IC_{50} -- K_i-Wert
Die bestehende Beziehung zwischen der Hemmstoffkonzentration, die eine 50%ige Hemmung verursacht (IC_{50}), und der Affinitätskonstante des Inhibitors

zum reaktionsfähigen Protein (K_i) wurde von Cheng und Prusoff (1973) detailliert beschrieben.
Bei den beschriebenen Bindungsexperimenten hemmte Harmalan die ^3H Flunitrazepam Bindung kompetitiv. In diesem Fall wurde die IC_{50} nach der Gleichung von Cheng und Prusoff (1973)

$$I_{50} = K_i \ (1 + S/K_m)$$

$$I_{50} = IC_{50}$$

errechnet.

4.6 Berechnung von Konzentrationen aus Zählraten
Die im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer gemessenen Impulse pro min (cpm) wurden in Zerfälle pro min (dpm) umgerechnet, wobei von einer Zählausbeute von 39% für ^3H ausgegangen werden konnte. Diese Zählausbeute war zuvor mit dem Standard ^3H Toluol bestimmt worden. Die Formel für die Umrechnung lautet:

dpm = cpm x 100/Zählausbeute

Für den Zerfall von ^3H- oder ^{14}C-markierten Stoffen gilt:

1 nCi = 2220 dpm

Aus diesen Angaben ließ sich die Konzentration berechnen:
Konzentration = dpm/2220 x spez. Aktivität

Ergebnisse:

1 In Vivo-Experimente

1.1 Klonische Krämpfe nach Harmalangabe bei naiven Tieren

Harman ist als physiologischer Bestandteil in verschiedenen Organen des Säugetieres nachgewiesen worden. Pharmakologisch löst es klonische Krämpfe aus. Das hier untersuchte Harmalan dient als Vorläufer in der Biosynthese dieses ß-Carbolins. Es war von Interesse, ob Harmalan neben seiner Rolle als Biosynthesevorstufe selbst pharmakologische Effekte auslösen kann.

Zunächst wurde das Harmalan Ratten in die Schwanzvene injiziert. Bei der niedrigsten applizierten Dosis von 3,13 mg/kg KG (17 uMol/kg) zeigten 8 von 10 Tieren laterales "head weaving" (d.i. langsame Seitwärtsbewegung des Kopfes), horizontale Abduktion der hinteren Extremitäten, Buckelbildung, Sträuben des Fells und Rumpftremor. Bei einer Dosis von 6,25 mg/kg KG zeigten die 10 Versuchstiere unmittelbar nach Injektion einen 2-3 h anhaltenden Rumpf- und Kopftremor. 5 dieser Tiere reagierten außerdem mit Ataxie, Tonuserhöhung der Muskulatur,was sich besonders im Ausbilden eines Buckels und Abspreizen der vorderen Extremitäten zeigte. Letzteres ist auf eine stärkere Tonuserhöhung der Extensoren als der Flexoren zurückzuführen. Zur weiteren Prüfung der

Muskeltonuserhöhung wurde das Verfahren nach Irwin (1968) angewandt. Dazu wurde das Tier am Nackenfell mit Daumen und Zeigefinger gegriffen und vertikal in die Höhe gehoben. Eine Pfote wurde mit Daumen und Zeigefinger der anderen Hand alternierend mehrmals gebeugt und gestreckt. Danach wurde mit der Kuppe des Zeigefingers leicht gegen die Bauchdecke gedrückt und so der Tonus der Bauchdecke festgestellt. Durch Vergleich mit naiven Ratten war eine qualitative Beurteilung des Muskeltonus gut möglich.

Diese als präklonische Symptomatik anzusehenen Phänomene waren bei den übrigen Tieren deutlich geringer ausgeprägt. Es bleibt jedoch festzuhalten, daß bei keinem Tier ein ausgeprägter Klonus zu beobachten war.

Nach Erhöhung der Dosis auf 8,59 mg Harmalan /kg KG reagierten 3 von 10 Tieren unmittelbar nach der Injektion mit deutlichen Kloni, die von postiktalen Erschlaffungsphasen abgelöst wurden. Unter Kloni werden dabei rhythmische Zuckungen der Extremitäten durch rasch aufeinanderfolgende, gleichförmig ablaufende Muskelkontraktionen mit Steigerung des Muskeltonus verstanden. Die übrigen 7 Tiere zeigten lediglich präklonische Bilder und bei 2 Tieren wurden zusätzlich Hemiparesen beobachtet. In letzterem Fall lagen die Tiere mit dem Rumpf flach auf der Unterlage und bemühten sich vergeblich, sich nur noch mit den Extremitäten einer Seite aufzurichten.

9,37 mg Harmalan /kg KG löste bei 7 Tieren sich wiederholende Kloni aus. 3 Tiere zeigten noch die bereits erwähnten präklonischen Zustände mit Tremor und Tonuserhöhung sowie außerdem Hemiparesen. 9 von 10 Versuchstieren reagierten auf die Applikation von 11,00 mg Harmalan /kg KG mit klonischen Krämpfen. Bei weiterer Erhöhung der Dosis auf 12,50 mg/kg KG hatten alle 10 Tiere extreme Kloni, die sich teilweise in bis zu meterhohen, unmittelbar aufeinanderfolgenden Sprüngen äußerten.

Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Die ED_{50} wurde nach einer logit-Transformation der erstellten Abbildung entnommen und betrug 9,03 mg/kg.

Tabelle 1: Konvulsive Wirkung einer Harmalan-Behandlung

HARMALAN DOSIS		KLONISCHE KRÄMPFE		
mg/kg	uMol/kg	ohne Diazepam	mit 0,7mg/kg Diazepam	mit 1,4mg/kg Diazepam
3,13	17,0	0	-	-
6,25	33,9	0	-	-
8,59	46,7	3	-	-
9,37	50,9	7	-	-
11,00	59,7	9	0	-
12,50	67,9	10	3	1
15,00	81,5	-	7	3
20,00	108,6	-	10	5
22,50	122,2	-	-	8
25,00	135,8	-	-	10

10 min nach Diazepam-Vorbehandlung wurden den Tieren verschiedene Dosen von Harmalan in die Schwanzvene injiziert. Bei jeder Dosis wurde das Verhalten von 10 Tieren beobachtet. Die Zahlen in der Tabelle entsprechen der Anzahl der mit Kloni reagierenden Tiere.

1.2 Vergleich der krampfauslösenden Potenz von Harmalan mit anderen ß-Carbolinen

Die in Abb. 1 dargestellten Dosis-Wirkungskurven für Harman, Norharman, THN und Harmalin wurden mit Genehmigung der Verfasser einer Arbeit von Rommelspacher et al. (1981) entnommen. Ergänzt wurde die Darstellung durch die Dosis-Wirkungskurve für Harmalan.

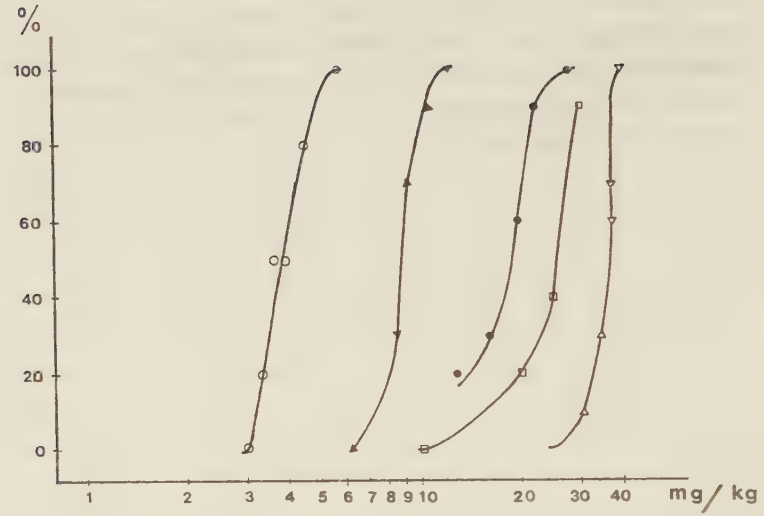


Abb. 1: Dosis-Wirkungskurven für durch verschiedene ß-Carboline ausgelöste klonische Krämpfe. Jeder Wert repräsentiert die Anzahl der Tiere in % der pro Gruppe eingesetzten Tiere (n = 10). Die Beobachtungszeit dauerte 15 min. Die Ordinate gibt die Zahl der krampfenden Tiere in % an, auf der Abszisse ist die jeweils applizierte Dosis in mg/kg Körpergewicht (KG) verzeichnet.

○ Harman, ▲ Harmalan, ● Harmalin, □ Norharman, ▽ THN.

Danach ist Harmalan nach Harman (ED_{50}: 3,6 mg/kg) die stärkste kloniauslösende Substanz aller untersuchten ß-Carboline mit einer ED_{50} von 9,03 mg/kg. Die schwächste kloniauslösende Wirkung wurde mit THN mit einer ED_{50} von etwa 36,5 mg/kg erzielt (Rommelspacher et al., 1981). Der Verlauf der einzelnen Dosis-Wirkungskurven für die 5 Konvulsiva war annähernd gleich. Allerdings ergab die statistische Analyse, daß die ergänzte Kurve für Harmalan in ihrer Neigung der des THN am ehesten entsprach. Wenn die Steigung einer gemeinsamen Regressionsgeraden für Harman, Norharman, Harmalin mit der einer gemeinsamen Regressionsgeraden für Harmalan und THN verglichen wurde, ergaben sich signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

1.3 Klonische Krämpfe nach Harmalangabe nach Vorbehandlung der Tiere mit Diazepam

Unter der Annahme, daß die durch Harmalan dosisabhängig ausgelösten Krämpfe über das Benzodiazepin-GABA-System vermittelt werden, und andere mögliche neuronale Mechanismen außer acht gelassen werden, dann sollte eine Vorbehandlung der Tiere mit dem Benzodiazepin-Rezeptor-Agonisten Diazepam eine Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve bewirken.

Wie aus Abb. 2 ersichtlich kam es zu einer nahezu parallelen Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve in Abhängigkeit von der Diazepam-Dosis.

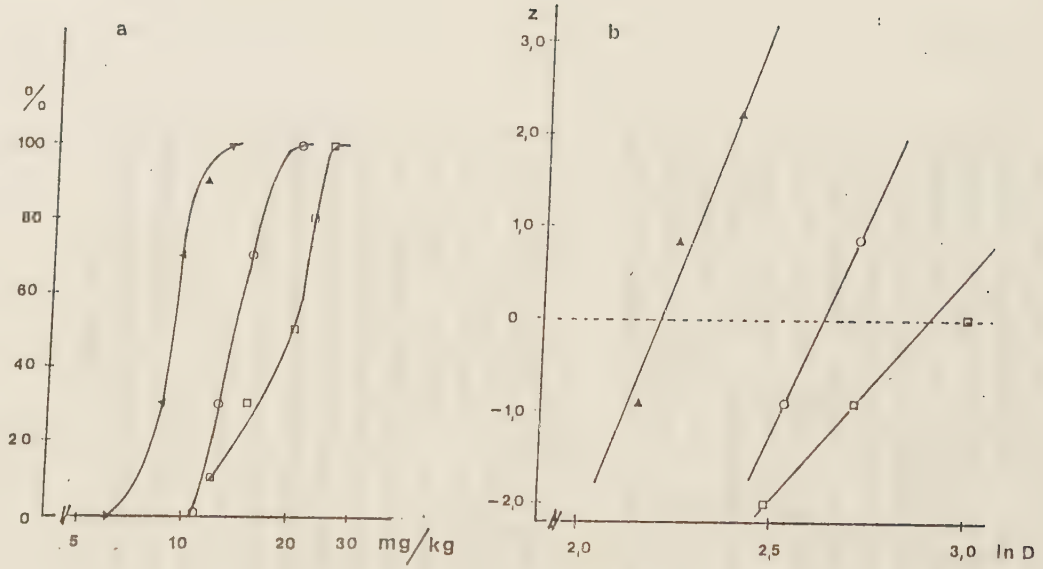


Abb. 2: Klonische Krämpfe, ausgelöst durch Harmalan nach Diazepam-Vorbehandlung. Die Abbildung 2a zeigt die Zahl der krampfenden Tiere in % (Ordinate) in Abhängigkeit von verschiedenen Harmalan-Dosen (Abszisse) ohne (▼-▼-▼) und mit Diazepam-Vorbehandlung (o-o-o, 0,7 mg Diazepam/kg; □-□-□, 1,4 mg Diazepam/kg). Jeder dargestellte Wert repräsentiert die Anzahl der Tiere in % der pro Gruppe eingesetzten Tiere (n = 10). In Abb. 2b sind die Werte nach logit-Transformation (z, Ordinate) in Abhängigkeit von ln der applizierten Dosis (Abszisse) als Regressionsgeraden dargestellt. Verwendet sind die gleichen Symbole wie in Abb. 2a.

Prinzipiell war die Krampfsymptomatik wie bei den unter 1.1 beschriebenen naiven Tieren (Tab. 1). Dabei blieben Kloni, Ataxie und Tremor jedoch z.T. auf Kopf- und Schulterbereich beschränkt. Bei der anderen Gruppe traten wie bereits beschrieben klonische Krämpfe der gesamten Muskulatur auf, die sich in der Dosierung von 12,50 mg/kg KG als bis zu meterhohe Sprünge äußerten. Außerdem trat die Symptomatik meist erst 5 min nach Injektion auf. Die nach einer logit-Transformation ermittelten ED_{50} -Werte betrugen für die mit 0,7 mg Diazepam /kg KG vorbehandelten Tiere 13,80 mg/kg KG und für die mit der doppelten Dosis Diazepam behandelten Tiere 18,17 mg/kg KG.

1.4 Klonische Krämpfe nach Tryptamingabe bei mit Pargylin vorbehandelten Tieren

Das Auftreten klonischer Krämpfe, wie prinzipiell nach Harmalanbehandlung der Ratten gezeigt, wurde auch bei Vorbehandlung der Tiere mit Indolderivaten wie z.B. Tryptamin und 5-HT beschrieben. Von Interesse war, ob die durch Harmalan ausgelösten Effekte mit denen durch Tryptamin verursachten vergleichbar waren.

Zunächst wurden 10 mg Pargylin /kg KG (51 uMol/kg) zur Monaminoxidase(MAO)-Hemmung i.p., dann nach 90 min Tryptamin ebenfalls i.p. injiziert.

Bei den Versuchstieren wurde ein bilaterales Anheben der Vorderpfoten mit Spreizen der Zehen beobachtet. Dieses Phänomen wurde in Anlehnung an das von Niemegeers et al. (1977) sowie Maj et al. (1982) beschriebene Kriterium als Tryptamin-induzierte Kloni bewertet.

Bei der niedrigsten applizierten Dosis von 40 mg Tryptamin /kg KG (203,5 uMol/kg) reagierten 2 von 10 Tieren in dieser Weise. Bei den übrigen 8 Tieren wurde lediglich ein Kreisen der Vorderpfoten und/oder rhythmische Zuckungen im Kopf- und Nackenbereich beobachtet.

Bei der Dosis von 50 mg Tryptamin/kg KG (254,4 uMol/kg) reagierten 3 von 10 Tieren mit Kloni. Bei fast allen Tieren dieser Gruppe kam es außerdem zu den bereits erwähnten rhythmischen Zuckungen im Bereich der Kopf- und Nackenmuskulatur und zum Abspreizen der hinteren Extremitäten, wie es von Serotonin-behandelten Tieren her bekannt ist. Der Muskeltonus der abgespreizten hinteren Extremitäten war nahezu paralytisch.

Bei der Dosis von 60 mg Tryptamin/kg KG (305,3 uMol/kg) und 75 mg Tryptamin/kg KG (381,6 uMol/kg) reagierten 7 von 10 Tieren mit Kloni; bei der höchsten Dosis von 90 mg/kg KG (457,9 uMol/kg) zeigten alle 10 Versuchstiere Myocloni der vorderen Extremitäten. Die Dosisabhängigkeit für das Auftreten klonischer Krämpfe ist in Tabelle 2 dar-

gestellt.

Die Daten wurden einer logit-Transformation zur Errechnung der LD_{50} (LD_{50} : 56,83 mg/kg KG) unterzogen.

Tabelle 2: Konvulsive Wirkung einer Tryptamin-Behandlung

TRYPTAMIN DOSIS		KLONISCHE KRÄMPFE
mg/kg	uMol/kg	(Zahl der Tiere)
40	203,5	2
50	254,4	3
60	305,3	7
75	381,6	7
90	457,9	10

60-90 min nach Pargylin-Vorbehandlung wurden den Tieren verschiedene Dosen von Tryptamin i.p. verabreicht. Bei jeder Dosis wurde das Verhalten von 10 Tieren beobachtet.

Gelegentlich wurde unter allen Dosierungen ein Kreuzen der Vorderpfoten beobachtet. Weiterhin fiel nahezu bei allen Tieren ein Exophthalmus mit Mydriasis auf.

Wie bereits erwähnt löste Harmalan ausgeprägte Krämpfe der Muskulatur an Rumpf und Extremitäten aus. Ferner kam es zu Kopf- und Rumpftremor, gelegentlich Ataxie, Buckelbildung und Abspreizen der vorderen Extremitäten. Somit war diese Symptomatik deutlich von der nach Tryptaminbehandlung verschieden.

1.5 Klonische Krämpfe nach Harmalangabe nach Vorbehandlung der Tiere mit Pargylin und Tryptamin
Die folgenden Experimente sollten zeigen, ob die Kombination von Harmalan und Tryptamin zu einer Verstärkung der Symptomatik führte.

In allen Experimenten wurden die Tiere mit intraperitonealen Gaben von 10 mg Pargylin /kg KG und 40 mg Tryptamin /kg KG, der in Vorversuch niedrigsten effektiven Dosis, bei der 2 von 10 Tieren mit Kloni reagierten, vorbehandelt. Bei niedrigerer Dosierung zeigten die Ratten keine auffällige Reaktion. Etwa 10 min nach Applikation (Adaptationszeit) wurde den Tieren Harmalan in die Schwanzvene injiziert.

Steigende Dosen von Harmalan führten bei den mit Tryptamin vorbehandelten Tieren zu einer deut-

lichen Linksverschiebung der Harmalan-Dosis-Wirkungskurve (Abb. 3). Die ED_{50} betrug 1,75 mg/kg KG bzw. 9,5 umol/kg.

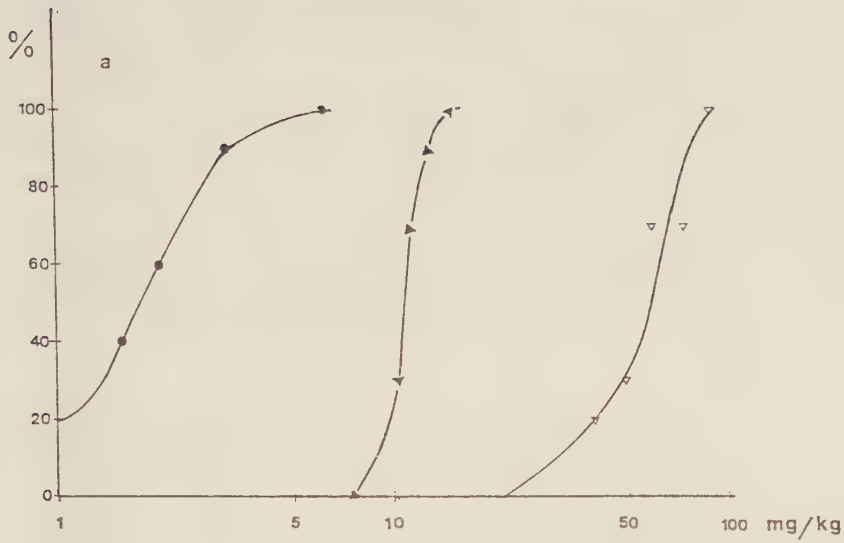


Abb. 3a: Klonische Krämpfe, ausgelöst durch Harmalan nach Tryptamin-Vorbehandlung. Die Abbildung zeigt die Zahl der krampfenden Tiere in % (Ordinate) in Abhängigkeit von der Dosierung (Abszisse): ▽-▽-▽ , Tryptamin-Dosiswirkungskurve; ▼-▼-▼ , Harmalan-Dosiswirkungskurve; ●-●-● , Harmalan-Dosiswirkungskurve nach Vorbehandlung der Tiere mit 40 mg Tryptamin/kg KG. Jeder dargestellte Wert repräsentiert die Anzahl der Tiere in % der pro Gruppe eingesetzten Tiere (n = 10).

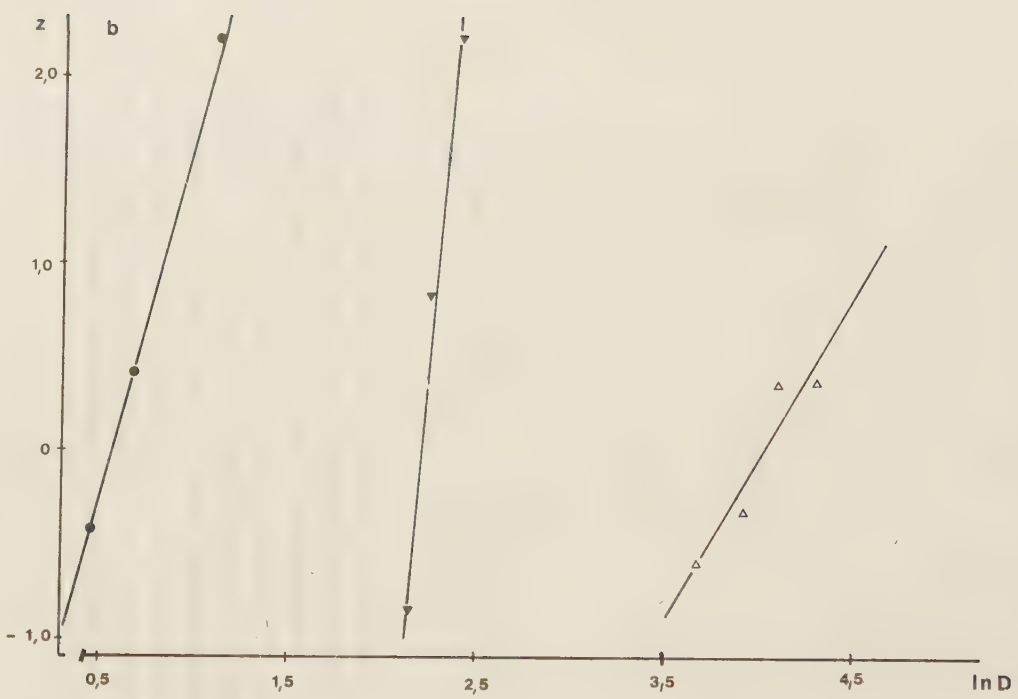


Abb. 3b: Klonische Krämpfe, ausgelöst durch Harmalan nach Tryptamin-Vorbehandlung. Die Abbildung zeigt die Daten der Abb. 3a nach logit-Transformation als Regressionsgeraden. Auf der Ordinate sind die Werte nach Transformation der %-Zahl der krampfenden Tiere (z-Werte) aufgeführt, die Abszisse zeigt die ln der applizierten Dosen. Verwendet sind die gleichen Symbole wie in Abb. 3a.

Die Tiere, denen sowohl 40 mg Tryptamin/kg KG als auch 6,25 mg Harmalan/kg KG - eine Dosierung, die ohne Tryptamin-Vorbehandlung keine Krämpfe auslöste - appliziert wurden, zeigten einen maximalen Effekt. So zeigten alle 10 Versuchstiere klonische Krämpfe, die ihre stärkste Ausprägung nach ca. 20 min erfuhren und die sich bei 2 Tieren sogar in maschinengewehrartigen Krämpfen v.a. im Bereich von Schulter, Nacken und vorderer Extremität äußerten.

Von allen Tieren zeigten nur 2 ein sehr viel schwächeres Bild der Krampfsymptomatik. Hier war ein Tremor mit peristaltischen Krämpfen vorherrschend.

Unmittelbar nach der stärksten Krampfausprägung lagen alle Tiere flach auf dem Bauch mit von sich gestreckten Extremitäten; ihre Bauchdecke war schlaff, und sie zeigten das Phänomen des "screaming on touch" (Schreien auf Berührung). Bemerkenswert waren Kot- und Harnverhaltung. Von den 10 Versuchstieren überlebten 5 die nächsten 24 h und zeigten da noch geringe Symptome wie z.B. Rückwärtsbewegung.

Die Behandlung der 10 Tiere mit 3,13 mg Harmalan /kg KG und Vorbehandlung mit 40 mg Tryptamin/kg KG löste bei 9 Tieren solche Kloni der Vorderpfoten aus, wie sie zuvor durch Tryptaminbehandlung (40 mg/kg KG) allein auch bei 2 von 10 Tieren

beobachtet werden konnten. Außerdem verliefen die Krämpfe peristaltisch vom Kopf zum Schwanz. Neben dieser Krampfsymptomatik bewegten sich die Ratten rückwärts, zeigten das Straub'sche Schwanzphänomen und spreizten ihre hinteren Extremitäten. Nach 24 h lebten noch 6 Versuchstiere dieser Gruppe.

Die Kombination mit der niedrigsten Harmalan-Dosis von 1,56 mg/kg KG löste ein noch ähnlicheres Bild der Krampfsymptomatik aus wie es nach Tryptamin-applikation allein beobachtet wurde. Von den 10 Versuchstieren dieser Gruppe waren 6 völlig symptomfrei; alle Tiere überlebten die folgenden 24 h. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Konvulsive Wirkung einer Harmalan-Behandlung nach Vorbehandlung der Tiere mit Pargylin und Tryptamin

HARMALAN DOSIS		KLONISCHE KRÄMPFE	
mg/kg	uMol/kg	nach 40mg/kg Tryptamin (203,5 uMol/kg)	ohne Tryptamin
0	0	2	-
1,56	8,5	4	-
2,00	10,9	6	-
3,13	17,0	9	-
6,25	33,9	10	0
8,59	46,7	-	3
9,37	50,9	-	7
11,00	59,7	-	9
12,50	67,9	-	10

60-90 min nach Pargylin-Vorbehandlung wurde den Tieren 40 mg Tryptamin/kg KG bzw. 0,9% NaCl-Lösung i.p. verabreicht. Nach 10 min Adaptationszeit erhielten die Tiere verschiedene Dosen von Harmalan i.p. Bei jeder Dosis wurde das Verhalten von 10 Tieren beobachtet. Die Zahlen in der Tabelle entsprechen der Anzahl der mit Kloni reagierenden Tiere.

Erwähnt werden soll ferner die Beobachtung, daß viele Tiere, bei denen dann nach Harmalan-Gabe Krämpfe auftraten, Verhalten wie Rückwärtslaufen, Tippeln mit den Vorderpfoten, angedeutetes Straub-Phänomen, peristaltische Krampfwellen vom Kopf zum Schwanz verlaufend und Kloni, die zu Rückwärtsbewegung führten, zeigten.

Die hier geschilderten Beobachtungen zur präklonischen bzw. klonischen Symptomatik nach Gabe von Harmalan, Tryptamin nach Vorbehandlung mit Pargylin und der Kombination von Harmalan und Tryptamin nach Pargylinvorbehandlung sind in einer Übersicht (Tab. 4) zusammengestellt. Außerdem wurden Befunde von Jacobs (1976), Jacobs et al. (1976) und Fletscher und Harding (1981) zur durch Serotonin ausgelösten Symptomatik ergänzt.

Tab. 4: Präklonische bzw. klonische Symptomatik nach Gabe v. Harmalan, Tryptamin n. Pargylinvorbehandlung und serotonergen Substanzen

SYMPTOM	HARMALAN	TRYPTAMIN	HARMALAN U. TRYPTAMIN	SEROTONERGE SUBSTANZEN[1,6]
"head weaving"	+			+
rhythm. Zuckungen d. Kopfes		+		
Kopf-,Rumpf-Tremor	+[2]			+
Mydriasis		+	+	
Exophthalmus		+	+	
Buckelbildung	+			
muskulärer Hypertonus (Rigidität)				+
peristaltische Krämpfe über d. Rumpf caudalwärts			+	
Kloni				
synchrones Anheben d. Vorderpfoten u. Spreizen d. Zehen		+	+[3]	
Krämpfe in Kopf-, Schulter-, Extremitäten-bereich	+		+[4]	
maschinengewehrartiges Hochschnellen von d. Unterlage			+[5]	
postiktale Erschlaffung	+		+	
"screaming on touch"			+	
"wet dog shake"				+[7]
Abspreizen d. vorderen Extremitäten	+			
Abspreizen d. hinteren Extremitäten	+	+	+	+
Kreuzen d. Vorderpfoten		+		
Tippeln d. Vorderpfoten	+		+	+
Rückwärtslaufen			+	
Gangataxie	+			
Hemiparese	+			
Straub Phänomen			+	+
Kot-, Harnverhaltung			+	

(1) Jacobs (1976), Jacobs et al. (1976), Fletscher und Harding, 1981); (2) mittel- grobschlägiger Tremor; (3) bis zu einer Dosis von 3,13 mg/kg; (4) bis zu einer Dosis von 6,25 mg/kg; (5) bei 2 von 10 Tieren bei 6,25 mg/kg; (6) als "Serotonin-Hyperaktivitätssyndrom" bei Jacobs (1976), Jacobs et al. (1976) beschrieben; (7) gehört nicht zum "Serotonin-Hyperaktivitätssyndrom" (Fletscher u. Harding, 1981)

1.6 Motorische Aktivität nach Harmalangabe

I.p. Applikation von Harmalan führte zu einem dosisabhängigen Anstieg der Spontanaktivität der Versuchstiere. Dieser Effekt war ähnlich dem, der durch Tryptaminbehandlung der Ratten nach Pargylinvorbehandlung (50 mg/kg KG) auch ausgelöst werden konnte. Allerdings war die Aktivität des Tryptamins, wenn man die Dosis-Wirkungskurven vergleicht, etwa 6 x höher als die des Harmalans. Tryptamin ist somit bei gleicher Dosierung wirksamer als Harmalan. Eine Vorbehandlung der Tiere mit Pargylin und Harmalan führte zu einer Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve und zu höherer maximaler Aktivität als bei den Tieren, die nur mit Harmalan vorbehandelt waren. Eine Behandlung der Ratten mit Pargylin, Tryptamin und Harmalan führte zu einer weiteren Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve (Abb. 4).

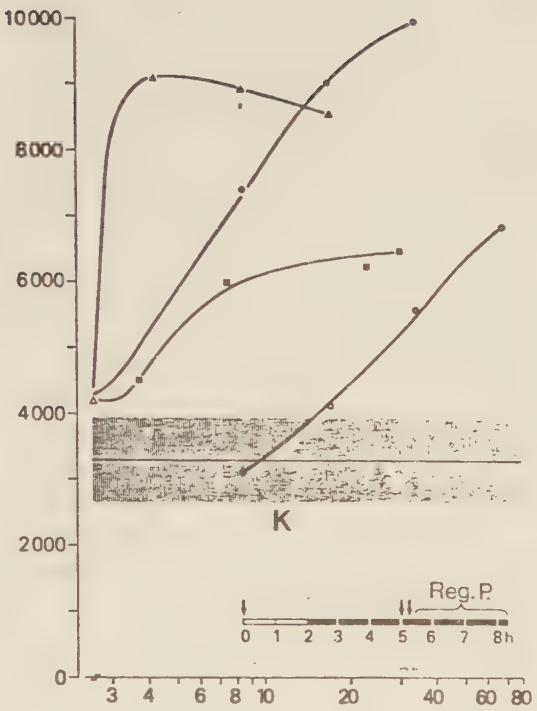


Abb. 4: Wirkung von Harmalan und Tryptamin auf die motorische Aktivität von Ratten während der Dunkelperiode. Auf der Ordinate sind die Einheiten der motorischen Aktivität, auf der Abszisse die jeweils applizierte Dosis in uMol/kg KG angegeben. Die Werte sind Mittelwerte für 10 Ratten. Deren Standardabweichungen entsprechen nahezu denen der Kontrolltiere.
K: Kontrolltiere; die Pfeile kennzeichnen die Zeitpunkte der Injektionen. Reg.P.: Registrierperiode.
▼ 255,4 uMol Pargylin/kg KG, 15,6 uMol Tryptamin/kg KG u. Harmalan,
● 255,4 uMol Pargylin/kg KG u. Harmalan,
■ 255,4 uMol Pargylin/kg KG u. Tryptamin,
○ 0,9% NaCl u. Harmalan

2 In Vitro-Experimente

Die beschriebenen in vivo Experimente, in denen Ratten Harmalan sowohl ohne als auch nach Diazepam-Vorbehandlung bekommen hatten, legten die Vermutung nahe, daß der GABA-Benzodiazepin-Mechanismus an der Harmalan-Wirkung beteiligt ist. In vitro Experimente zur Wechselwirkung von Benzodiazepinen und Harmalan am Benzodiazepin-Rezeptor sollten diese Frage beantworten.

2.1 Ermittlung der Daten zur spezifischen Bindung von ^{3}H Flunitrazepam

Wurden die Rattenhirnsynaptosomen mit zunehmenden Konzentrationen von ^{3}H Flunitrazepam inkubiert, zeigte sich nach entsprechender Auswertung unter Berücksichtigung von Total- und unspezifischer Bindung das typische Sättigungsverhalten einer spezifischen Ligandenbindung; die unspezifische Bindung dagegen verlief in dem untersuchten Konzentrationsbereich linear (Abb. 5).

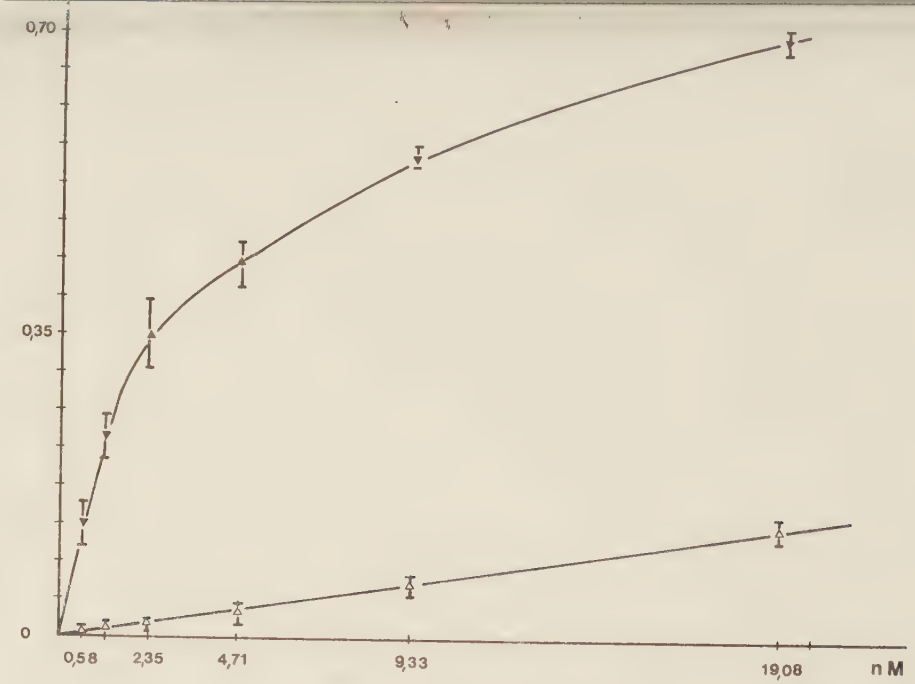


Abb. 5: Spezifische und unspezifische ^{3}H Flunitrazepam-Bindung. Ordinate: Bindung von ^{3}H Flunitrazepam in pMol/mg Eiweiß. Abszisse: nM Konzentration von ^{3}H Flunitrazepam im Inkubationsmedium. Die Ansätze wurden in Abwesenheit (= totale Bindung) oder in Gegenwart von 50 uM Diazepam (Δ-Δ-Δ, = unspezifische Bindung) 40 min bei 4^{o} C inkubiert. Aus der Differenz der totalen und der unspezifischen Bindung ergab sich die spezifische Bindung (▲-▲-▲). Angegeben sind Mittelwerte aus 3-6 Bestimmungen + mittlerer Fehler des Mittelwertes.

Die Daten der spezifischen Bindung wurden zur Ermittlung der Bindungskonstante (K_D) und der maximalen spezifischen Bindung (Bmax) nach Scatchard (1949) aufgetragen (Abb. 6).

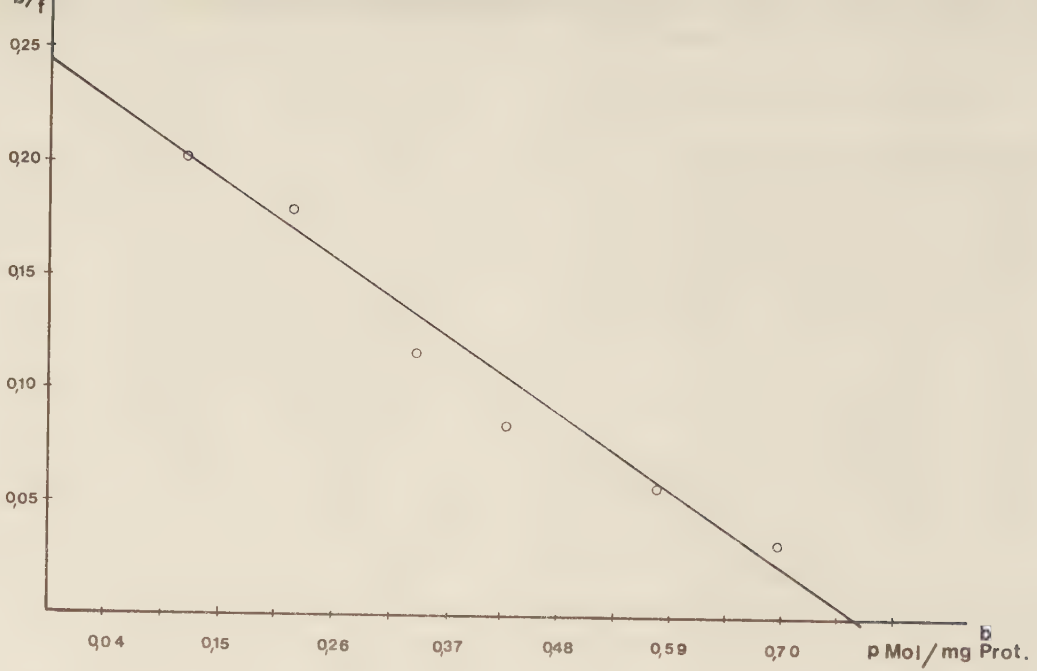


Abb. 6: Scatchard-Plot von spezifisch gebundenem ^{3}H Flunitrazepam. Die Werte von spezifisch gebundenem ^{3}H Flunitrazepam aus der Abb. 5 wurden nach Scatchard aufgetragen. Gebunden = pMol spezifisch gebundenes ^{3}H Flunitrazepam pro mg Eiweiß; frei = Konzentration von ^{3}H Flunitrazepam im Inkubationsmedium in nM. Die Werte sind Mittelwerte aus 3-6 Bestimmungen. Ihre Standardabweichungen betrugen in keinem Fall mehr als 22%.

Es ergab sich ein K_D -Wert von 2,91 nM und eine Bmax von 774 fMol pro mg Protein.

3.2 Einfluß von Harmalan auf die spezifische Bindung von ^3H Flunitrazepam

Da verschiedene ß-Carboline die Benzodiazepin-Rezeptor-Bindung konzentrationsabhängig hemmen (Rommelspacher et al., 1980 b) war es von Interesse, auch den Einfluß von Harmalan zu untersuchen. Wie aus dem Säulendiagramm der Abb. 7 ersichtlich ist, führte Harmalan zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der spezifischen ^3H Flunitrazepam-Bindung. Mit den Daten wurde eine Dosis-Wirkungskurve erstellt, die als Einschub der Abb. 7 gezeigt ist.

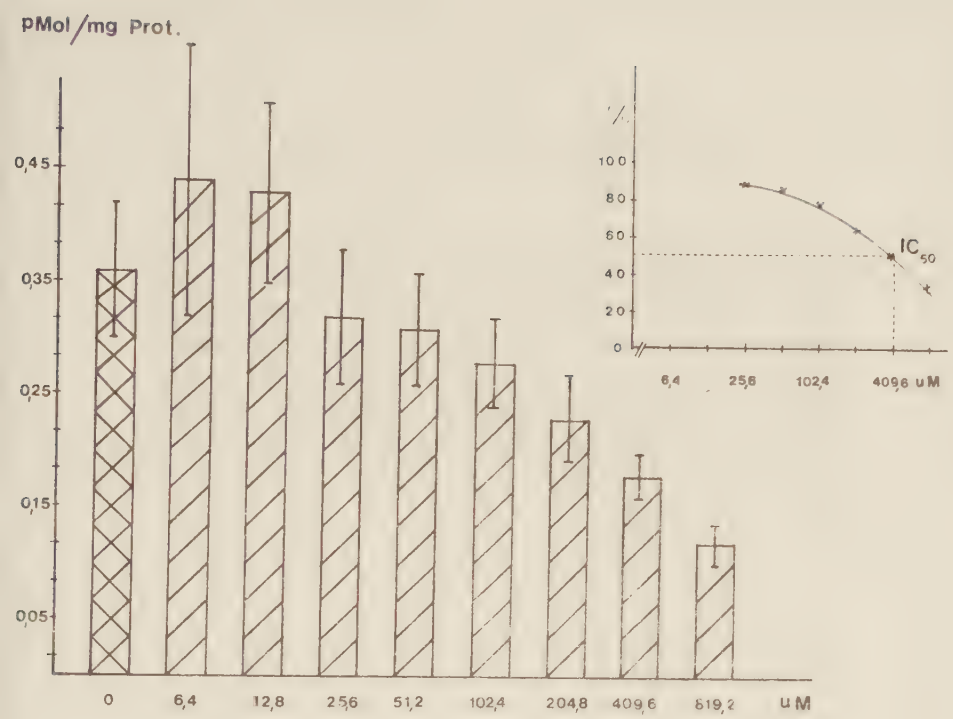


Abb. 7: Einfluß von Harmalan auf die spezifische Bindung von ^{3}H Flunitrazepam.
Die Höhe der Säulen gibt die spezifische Bindung in pMol/mg Eiweiß an, auf der Abszisse sind die Harmalankonzentrationen im Inkubationsmedium angegeben. Die Gewebepräparation wurde mit 1,17 nM ^{3}H Flunitrazepar 40 min in Gegenwart von 50 uM Diazepam sowie den verschiedenen Harmalankonzentrationen inkubiert. Mittelwerte und deren Standardabweichung aus 3-6 Versuchen.
Der Einschub zeigt die Dosis-Wirkungskurve für die im Säulendiagramm dargestellten Daten.

Aus dieser Darstellung wurde ein IC_{50}-Wert von 419,0 uM ermittelt.

Zur Charakterisierung dieser Hemmung wurden die Werte für die spezifische ^{3}H Flunitrazepam-Bindung (Kontrolle) und die der spezifischen Bindung unter Einfluß von 400 uM Harmalan im Scatchard-Diagramm aufgetragen (Abb. 8). Die Hemmung der Benzodiazepin-Rezeptor-Bindung ist kompetitiv, wie aus der Darstellung hervorgeht. Die Bmax wird durch Harmalan nicht beeinflußt.

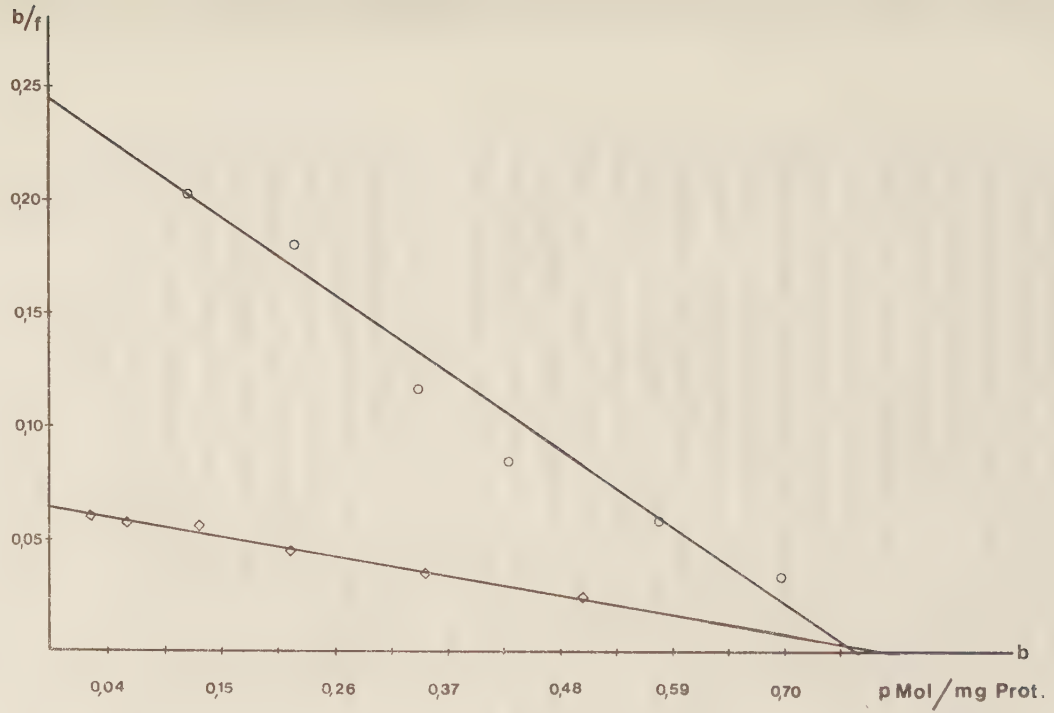


Abb. 8:Scatchard Plot von spez. gebundenem ^{3}H Flunitrazepam in Gegenwart (◇-◇-◇) und in Abwesenheit (O-O-O) von Harmalan. Bedingungen wie bei Abb. 6.

Diskussion:

Harmalan (1-Methyl-3,4-dihydro-ß-carbolin) wird im Rattenhirn synthetisiert und stellt eine Vorstufe in der Biosynthese von Harman und Tetrahydroharman dar. Beide kommen in verschiedenen Organen des Säugers vor. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß Harmalan nicht nur Precursor-Funktion für andere ß-Carboline hat, sondern selbst pharmakodynamische Effekte auslösen kann. So zeigten die mit Harmalan behandelten Ratten bei freier Bewegungsmöglichkeit ("open field situation") vor allen Dingen einen Tremor. Einige der Tiere zeigten laterales "head weaving" und Abduktion der hinteren Extremität. Andere wiederum reagierten mit Rückwärtslaufen und Tippeln mit den Vorderpfoten. Diese Symptome gelten auch als Zeichen beim "Serotonin-Hyperaktivitätssyndrom". Allerdings fehlte bei der Beobachtung als typisches Serotonin-Symptom das Spreizen der Zehen.

Darüberhinaus abduzierten die Harmalan-vorbehandelten Tiere auch die vordere Extremität und zeigten verstärkt ataktische Bewegung, die möglicherweise auf eine größere cerebrale Erregung zurückgeführt werden kann. Die höchste Dosis veranlaßte die Tiere zu Sprüngen, die bei Serotonin- oder Tryptaminbehandlung nicht auftreten.

Besonderes Augenmerk galt in dieser Arbeit den durch Harmalan induzierten klonischen Krämpfen.

Auch andere ß-Carboline, die über das Harmalan als Zwischenstufe in ihrer Biosynthese entstehen, haben selbst konvulsive Eigenschaften und können als Vermittler der nach Harmalan-Applikation beobachteten Wirkungen nicht völlig ausgeschlossen werden. Dies würde allerdings eine überaus rasche Metabolisierung voraussetzen, da die in vivo Effekte unmittelbar nach Harmalan-Injektion zu beobachten waren. Ferner sprechen die in vitro Befunde (s.u.) für Harmalan als eigentliches pharmakodynamisches Prinzip. Bei den in vivo Untersuchungen der ß-Carboline erwies sich Harman als stärkste krampfauslösende Substanz (ED_{50} : 3,6 mg/kg KG) (Rommelspacher et al., 1981) gefolgt von Harmalan (ED_{50}: 9,0 mg/kg KG). Dieses hat eine 1,4 x geringere ED_{50} als das bekannte Krampfgift Pentylentetrazol und eine 14 x höhere als Pikrotoxin.

Um erste Hinweise zum möglichen Wirkungsmechanismus des Harmalans zu erhalten, wurden die in vivo Effekte dieses ß-Carbolins nach Vorbehandlung der Versuchstiere mit Diazepam bzw. Tryptamin untersucht. Diesem experimentellen Ansatz liegen folgende Überlegungen zugrunde: Einmal gelten die ß-Carboline als inverse Agonisten der Benzodiazepine im Benzodiazepin-GABA-System wegen ihrer hohen Potenz, die Bindung der Benzodiazepine an ihrem Rezeptor zu inhibieren

(Braestrup et al., 1980; Rommelspacher et al., 1980 b). Zum anderen existieren für Tryptamin im Rattenhirn hoch affine Bindungsstellen (Kellar und Cascio, 1982), die sich von denen für Serotonin unterscheiden. Die Strukturverwandtschaft des Harmalans zum Tryptamin bzw. Serotonin deutet auf eine Kompetition beider Substanzen an den Tryptamin- bzw. Serotonin-Bindungsstellen hin (Rommelspacher et al., 1985).

Diese Strukturähnlichkeit mit Indolderivaten und die oben beschriebenen Beobachtungen in den Tierversuchen legen nahe, daß bei der Erklärung der Harmalanwirkung an neuronale Mechanismen zu denken ist, die nicht nur durch Benzodiazepine sondern auch durch Tryptamin und Serotonin aktiviert werden.

Die Vorbehandlung der Ratten mit Diazepam führte zu einer nahezu parallelen Rechtsverschiebung der Harmalan-Dosis-Wirkungskurve. Die ED_{50} von 9,0 mg/kg KG (Kontrolle) nahm auf 14,4 mg/kg KG (= ED_{50} nach Vorbehandlung mit 0,7 mg Diazepam /kg KG) bzw. auf 17,6 mg/kg (= ED_{50} nach Vorbehandlung mit 1,4 mg Diazepam /kg KG) zu. Die Dosis-Wirkungs-Kurven zeigen 2 wichtige Eigenschaften, die als Voraussetzung für einen kompetitiven Antagonismus angesehen werden: 1. Es kommt zu einer parallelen Rechtsverschiebung der log-Dosis-Wirkungs-Kurven. 2. Beide Kurven zeigen denselben maximalen Effekt. Bei einem nicht-kompetitiven Antagonismus sind gerade diese beiden Voraussetzungen nicht gegeben.

Zudem war eine statistische Analyse der Dosis-Wirkungskurven nötig, um zu sehen, ob tatsächlich eine Parallelverschiebung vorlag.

Dieser Befund steht in guter Übereinstimmung mit dem kompetitiven Diazepam-Antagonismus für Harman-induzierte Krämpfe (Rommelspacher et al., 1981), wo es allerdings zu einer etwa 1,5fach stärkeren Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurven kommt.

Für die vergleichenden Untersuchungen mit Tryptamin war eine vorausgehende Hemmung der MAO - Tryptamin ist ein Substrat für dieses Enzym - durch Pargylin erforderlich. Der Umsatz von Tryptamin ist sehr schnell und liegt bei einer Halbwertszeit (HWZ) von etwa 2 min. Die Vorbehandlung der Ratten mit der Kombination aus Pargylin, Tryptamin (40 mg/kg KG) - im Kontrollversuch selbst nahezu unwirksam - und verschiedenen Dosen von Harmalan führte zu einer deutlichen Linksverschiebung der Harmalan-Dosis-Wirkungskurve (ED_{50} : 1,8 mg/kg KG, ED_{50} ohne Vorbehandlung: 9,0 mg/kg KG).

In diesem Fall fehlt die Voraussetzung für einen kompetitiven Antagonismus. Auch ein nicht-kompetitiver Antagonismus scheidet nach Lage der Dosis-Wirkungskurven aus. Stattdessen kann von einem Synergismus gesprochen werden.

Mit anderen Worten bewirkt die Diazepam-Vorbe-

handlung eine Abschwächung, die Tryptamin-Vorbehandlung eine Verstärkung der konvulsiven Wirkung des Harmalans.

Diese Beobachtungen, die zwar eine Beeinflussung des Benzodiazepin-GABA-Systems auf der einen Seite und der zentralen Tryptamin-Wirkung auf der anderen Seite durch Harmalan nahelegen, sagen jedoch nichts über die Effizienz und physiologische Relevanz der Beeinflussung des einen oder anderen Mechanismus aus.

Die in vitro Experimente dieser Arbeit sollten einen Beitrag zur Klärung des o.g. Problems leisten. Die Affinitätskonstanten von Benzodiazepinen zu ihrem Rezeptor liegen bei Synaptosomenpräparationen aus Rattenhirnen üblicherweise im nM-Bereich. Von uns wurde ein K_D-Wert für ^3H Flunitrazepam von 2,94 nM ermittelt. Der K_D-Wert für die spezifische ^3H Diazepam-Bindung in Rattenhirn-Synaptosomen beträgt ebenfalls 3,6 nM (Möhler u. Okada, 1977 b). Die Hemmung dieser spezifischen Bindung durch das physiologisch vorkommende Harmalan dürfte in Hinblick auf das Benzodiazepin-GABA-System dann relevant sein, wenn seine Affinitätskonstante in einem vergleichbar niedrigen Konzentrationsbereich liegt. Dabei ist die Art der Hemmung (Hemmtyp) von untergeordneter Bedeutung. Doch zeigte Harmalan eine sehr geringe Affinität zu den spezifischen Bindungsstellen des ^3H Flunitrazepam. Sein K_i-Wert mit 419 uM lag um

etwa den Faktor 100 000 höher als der K_D-Wert des Agonisten. Die Analyse der Hemmwirkung ergab einen kompetitiven Mechanismus für Harmalan. Diese kompetitive Hemmung konnte ebenfalls in den in vivo Experimenten in Form einer Parallelverschiebung der Dosis-Wirkungskurve für Harmalan nach Diazepam-Vorbehandlung gezeigt werden.

Die in vitro Befunde könnten zwar von der Art der Hemmung her die in vivo Befunde erklären. Jedoch sind die für den in vivo Effekt notwendigen Dosen von Harmalan (12 mg/kg KG) so niedrig und die in vitro Affinität so gering (419 uM), daß die Befunde unabhängig voneinander interpretiert werden müssen.

Abgesehen von der konzentrationsabhängigen Hemmung der ^3H Flunitrazepam-Bindung in einem Konzentrationsbereich von 25,6 bis 819,2 uM kam es bei niedrigeren Konzentrationen des ß-Carbolins (6,4 und 12,8 uM) zumindest tendentiell zu einer Stimulation der ^3H Flunitrazepam-Bindung. Diese Wirkung könnte ein reiner Membraneffekt sein. Andererseits wäre auch eine Aktivierung von GABA-Rezeptoren mit dem Ergebnis einer verbesserten Flunitrazepam-Bindung in Betracht zu ziehen.

Verglichen mit Harmalan haben Harman und Norharman deutlich niedrigere Hemmstoffkonstanten. Ihre IC_{50} Werte liegen bei 8 uM. Harman ist damit der stärkste endogen vorkommende Inhibitor der

spezifischen Benzodiazepin-Bindung. Auf der anderen Seite liegt die IC_{50} von Tetrahydronorharman mit 942 uM etwa doppelt so hoch wie der entsprechende Wert von Harmalan (Rommelspacher et al., 1981). Bei dem Vergleich von IC_{50}- bzw. K_i-Werten ist allerdings immer zu berücksichtigen, daß die IC_{50} nicht identisch mit dem K_i-Wert ist, sofern eine kompetitive Hemmung vorliegt (Cheng und Prusoff, 1973). Die hohe Potenz von Harman und Norharman, die spezifische ^3H Flunitrazepam-Bindung zu hemmen, wurde auch von anderen Autoren bestätigt (K_i-Werte für beide Substanzen ca. 5 uM) (Saano u. Airaksinen, 1982).

Die geringe Potenz von Harmalan, die Bindung von ^3H Flunitrazepam an dem Benzodiazepin-Rezeptor zu inhibieren, spricht eher für die Wirkung dieses ß-Carbolins in einem anderen Mechanismus. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, daß Harmalan seine konvulsive Wirkung durch Stimulierung von bisher nicht nachgewiesenen ß-Carbolin-Rezeptoren auslösen könnte.

Rezeptorbindungsstudien an 5-HT_2-Bindungsstellen ergaben für Harmalan einen IC_{50}-Wert von 1,92 uM. Harmalan ist an diesen Bindungsstellen mit einer IC_{50} von 1,92 uM 200 x aktiver als am Benzodiazepin-Rezeptor. Darüberhinaus ist diese Verbindung von allen untersuchten ß-Carbolinen die wirksamste an den $5HT_2$-Bindungsstellen (Rommelspacher et al., 1985).

Die anfangs geschilderten, beobachteten Symptome nach Harmalan-Injektion könnten durch Serotonin-Rezeptoren vermittelt werden. So zeigten Marsden und Curzon (1979), daß 5-Hydroxytryptophan klonische Krämpfe in Tranylcypromin-vorbehandelten (zur MAO-Hemmung) Ratten über eine Stimulation von Serotoninrezeptoren auslöste. Demgegenüber vermuten Luscombe und Mitarbeiter (1982), daß Tryptamin-induzierte klonische Krämpfe nicht über 5-HT-Rezeptoren sondern wahrscheinlich über Tryptaminrezeptoren vermittelt werden. Die hohe Affinität des Harmalans zu den Tryptamin-Bindungsstellen (IC_{50}: 0,038 uM) (Rommelspacher et al., 1985) und die Linksverschiebung sprechen für eine Stimulation dieser Bindungsstellen durch Harmalan, die klonische Krämpfe verursachen könnte.

Bzgl. der Wechselwirkung zwischen Harmalan und Tryptamin auf der Ebene dieser hoch affinen Bindungsstellen erwies sich das ß-Carbolin als 11000 mal stärkerer Hemmstoff der spezifischen Tryptamin-Bindung als der ^{3}H Flunitrazepam-Bindung. Für diese Aussage wurde der Vergleich der jeweiligen IC_{50} -Werte von 419 uM und 38 nM zugrunde gelegt.

Darüberhinaus konnten Serotonin- und Benzodiazepin-Antagonisten die Harmalan-induzierten Krämpfe nicht aufheben bzw. verhindern, wie Rommelspacher und Mitarbeiter (1985) kürzlich zeigen konnten.

Bzgl. der Hemmung der ^{3}H Tryptamin-Bindung durch ß-Carboline liegen die IC_{50} -Werte von Harmalin, THN, Norharman und Harmalan in der gleichen Größenordnung (38-50 nM). Die ß-Carboline Harmin, Harman und Harmalol zeigen 1,5 - 2 x schlechtere Affinitäten (IC_{50} : 63-73 nM) zu diesen Bindungsstellen. Dagegen sind die Affinitäten dieser genannten Beispiele zu den 5-HT-Bindungsstellen 60 x im Falle von THN bis 3000 x im Falle des Harmalins schlechter (Rommelspacher u. Brüning, 1984). Eine Ausnahme stellt Harmalan dar, das nur eine 5 x geringere Affinität zum 5-HT-Rezeptor hat (Rommelspacher et al., 1985). Vergleicht man die in dieser Arbeit ermittelten, von Rommelspacher und Brüning (1984) sowie von Rommelspacher et al. (1985) publizierten IC_{50} - bzw. K_i -Werte, so kann keine Korrelation etwa derart gesehen werden, daß die ß-Carboline mit hoher Affinität zur Benzodiazepin-Bindungsstelle eine niedrige Affinität zu 5-HT- oder Tryptamin-Bindungsstellen bzw. umgekehrt haben.

Abgesehen von der Spekulation, daß ß-Carboline über eigene, bisher nicht nachgewiesene Rezeptoren wirken, sprechen die hier gezeigten Resultate für eine Aktivierung des vermuteten "Tryptamin-Rezeptors" durch Harmalan mit der Konsequenz einer konvulsiven Wirkung. Dabei kann davon ausgegangen werden, daß Tryptamin und Harmalan, möglicherweise auch andere ß-Carboline, gleichermaßen agonistisch wirken, und es deshalb zu einer Addition oder gar

Potenzierung der krampfauslösenden Eigenschaften kommen kann.

Bei dem beobachteten Synergismus zwischen Harmalan und Tryptamin bleibt jedoch die Frage offen, ob Harmalan nicht auf indirektem Wege über eine Konzentrationserhöhung von Tryptamin etwa durch Hemmung der MAO oder durch Hemmung eines Uptake-Mechanismus tryptaminerg wirken und daß serotonerge Mechanismen aktiviert werden könnten. Zumindest sind andere ß-Carboline wie z.B. THN potente Inhibitoren der Serotonin- und Noradrenalin-Aufnahme in Synaptosomen (Kellar et al., 1976; Rommelspacher et al., 1976; Buckholtz u. Boggan, 1977; Rommelspacher et al., 1978) und der MAO (Meller et al., 1977).

Zusammenfassung:

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, mögliche pharmakologische Wirkungen von Harmalan im Tierversuch zu untersuchen und in in vitro Experimenten seine mögliche Affinität zu Benzodiazepin-Bindungsstellen zu bestimmen. Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen sollten Hinweise für einen möglichen Wirkungsmechanismus dieses ß-Carbolins abgeleitet werden.

In den in vivo Experimenten wurde Harmalan Ratten, die nicht oder mit Diazepam bzw. Tryptamin vorbehandelt waren, appliziert und besonders auf Krampfgeschehen geachtet und die Motilität beobachtet. Bei den in vitro Experimenten wurde die spezifische Bindung von ^{3}H Flunitrazepam bestimmt und der Einfluß von Harmalan auf diese Bindung getestet.

Harmalan löst klonische Krämpfe aus und ist nach Harman die stärkste krampfauslösende Substanz von den untersuchten ß-Carbolinen bzw. deren Ethyl- und Methylester. Diazepam kann diese klonischen Konvulsionen antagonisieren, was sich in einer deutlichen Rechtsverschiebung der erstellten Dosis-Wirkungskurve zeigte. Andererseits bewirkt Vorbehandlung der Tiere mit Tryptamin eine Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve, was auf einen Synergismus zwischen Harmalan und Tryptamin hinweist. Diesen Beobachtungen hinsichtlich der

klonischen Krämpfe entsprechen auch die in der Arbeit gezeigten Motilitätsmessungen. Die Rezeptor-Bindungsstudien machen deutlich, daß die pharmakologischen Harmalaneffekte wohl nicht über den Benzodiazepin-Rezeptor vermittelt werden. Stattdessen sind Tryptamin-Bindungsstellen involviert, wie die gezeigten in vivo Experimente mit Tryptamin und kürzlich publizierte in vitro Experimente mit Harmalan an derartigen Bindungsstellen nahelegen.

Literatur

Blanchard, J.C., Boireau, A., Garret, C., Julou, L.: In vitro and in vivo inhibition by zopiclone of benzodiazepine binding to rodent brain receptors. Life Sci. 24: 2417-2420 (1979)

Borbe, H.O., Müller, W.E., Wollert, U.: The identification of benzodiazepine receptors with brain-like specifity in bovine retina. Brain Res. 182: 466-469 (1980)

Braestrup, C., Squires, R.F.: Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity ^{3}H diazepam binding. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 3805-3809 (1977)

Braestrup, C., Squires, R.F.: Brain specific benzodiazepine receptors. Br. J. Psychiat. 133: 249-260 (1978)

Braestrup, C., Nielsen, M., Olsen, C.E.: Urinary and brain ß-carboline-3-carboxylates as potent inhibitors of brain benzodiazepine receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2288-2292 (1980)

Brüning, G., Rommelspacher, H.: D+R High affinity ^{3}H tryptamine binding sites in various organs of the rat. Life Sci. 34: 1441-1446 (1984)

Buckholtz, N.S., Boggan, W.O.: Inhibition by ß-carbolines of monoamine uptake into a synaptosomal preparation: Structure-activity relationships. Life Sci. 20: 2093-2100 (1977)

Cantoni, G.L.: Biological methylation: selected aspects. Ann. Rev. Biochem. 44: 435-451 (1975)

Cheng, Y-C., Prusoff, W.H.: Relationship between the inhibition constant (K_I) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. Biochem. Pharmacol. 22: 3099-3108 (1973)

Costa, E., Guidotti, A., Toffano, G.: Molecular mechanisms mediating the action of diazepam on GABA receptors. Br. J. Psychiat. 133: 239-248 (1978)

Costa, E., Ferrari, M., Ferrero, P., Guidotti, A.: Multiple signals in GABAergic transmission: pharmacological consequences. Neuropharmacology 23: 989-991 (1984)

Damm, H.W., Müller, W.E., Schäfer, U., Wollert, U.: ^3H flunitrazepam: its advantages as a ligand for the identification of benzodiazepine receptors in rat brain membranes. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 22: 597-600 (1978)

Feldberg, W., Sherwood, S.L.: Injections of drugs into the lateral ventricle of the cat. J. Physiol. (Lond.) 123: 148-167 (1954)

Fletscher, A., Harding, V.: An examination of the 'wet dog' shake behaviour in rats produced by acute administration of sodium n-dipropylacetate. Pharm. Pharmacol. 33: 811-813 (1981)

Fuchs, V., Burbes, E., Coper, H., Wagner, N: Significance of biogenic amines for opioid induced locomotor activity in rats. Drug Alcohol Dependence 12: 233-242 (1983)

Greiner, B., Rommelspacher, H.: Two metabolic pathways of tetrahydronorharmane (tetrahydro-ß-carboline) in rats. Naunyn-Schmiedeberg`s Arch. Pharmacol. 325: 349-355 (1984)

Guidotti, A., Forchetti, C.M., Corda, M.G., Konkel, D., Bennett, C.D., Costa, E.: Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3531-3535 (1983)

Halpern, L.: Über die Harminwirkung im Selbstversuch. Dtsch. med. Wschr. 56: 651-655 (1930)

Honecker, H., Rommelspacher, H.: Tetrahydronorharmane (tetrahydro-ß-carboline), a physiologically occuring compound of indole metabolism. Naunyn-Schmiedeberg`s Arch. Pharmacol. 305: 135-141 (1978)

Irwin, S.: Comprehension observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. Psychopharmacologia (Berl.) 3: 222-257 (1968)

Jacobs, B.L.: An animal behavior model for studying central serotonergic synapses. Life Sci. 19: 777-789 (1976)

Jacobs, B.L., Trulson, M.E., Stern, W.C.: An animal behavior model for studying the action of LSD and related hallucinogens. Science 194: 741-743 (1976)

Jones, R.S.G.: Tryptamine: a neuromodulator or neurotransmitter in mammalian brain? Prog. Neurobiol. 19: 117-139 (1982)

Kellar, K.J., Elliott, G.R., Holman, R.B., Vernicos-Danellis, J., Barchas, J.D.: Tryptoline inhibition of serotonin uptake in rat forebrain homogenates. J. Pharmacol. Exp. Ther. 198: 619-625 (1976)

Kellar, K.J., Cascio, C.S.: ^{3}H Tryptamine high affinity binding sites in rat brain. Eur. J. Pharmacol. 78: 475-478 (1982)

Linder, A., Berchthold, W.: Statistische Auswertung von Prozentzahlen. Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart (1976)

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275 (1951)

Luscombe, G., Jenner, P., Marsden, C.D.: Tryptamine-induced myoclonus in guinea-pigs pretreated with a monoamine oxidase inhibitor indicates pre- and post-synaptic actions of tryptamine upon central indoleamine systems. Neuropharmacol. 21: 1257-1265 (1982)

Luscombe, G., Jenner, P., Marsden, C.D.: Alterations in brain 5-HT and tryptamine content during indoleamine-induced myoclonus in guinea-pigs. Biochem. Pharmacol. 32: 1857-1864 (1983)

Maj, J., Rogoz, Z., Skuza, G.: Fluvoxamine, a new antidepressant drug, fails to show antiserotonin activity. Eur. J. Pharmacol. 81: 287-292 (1982)

Marsden, C.A., Curzon, G.: The role of tryptamine in the behavioural effects of tranylcypromine + L-tryptophan. Neuropharmacol. 18: 159-164 (1979)

Meller, E., Friedman, E., Schweitzer, J.W., Friedhoff, A.J.: Tetrahydro-ß-carbolines: specific inhibitors of type A monoamine oxidase in rat brain. J. Neurochem. 28: 995-1000 (1977)

Möhler, H., Okada, T.: Benzodiazepine receptor: demonstration in the central nervous system. Science 198: 849 (1977a)

Möhler, H., Okada, T.: Properties of ^{3}H diazepam binding to benzodiazepine receptors in rat cerebral cortex. Life Sci. 20: 2101-2110 (1977b)

Naranjo, C.: Psychotropic properties of the harmala alkaloids. In: Efron, D.H., Holmstedt, B., Kline, N.S.: Ethnopharmacologic search for psychoactive drugs. Raven Press, N.Y., pp. 385-391 (1979)

Nielsen, M., Credal, O., Braestrup, C.: Some properties of ^{3}H diazepam displacing activity from human urine. Life Sci. 25: 679-686 (1979)

Niemegeers, C.J.E., Lenaerts, F.M., Artois, K.S.K., Janssen, P.A.J.: Interaction of drugs with apomorphine, tryptamine and norepinephrine. A new in vivo approach: the AAN-test in rats. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 227: 238-253 (1977)

Pannier, L., Rommelspacher, H.: Actions of tetrahydronorharmane (tetrahydro-ß-carboline) on 5-hydroxytryptamine and dopamine mediated mechanisms. Neuropharmacol. 20: 1-8 (1981)

Pennes, H.H., Hoch, P.H.: Psychotomimetics, clinical and theoretical considerations: harmine, WIN-2299 and nalline. Am. J. Psychiat. 113: 887-892 (1957)

Polc, P., Bonetti, E.P., Schaffner, R., Haefely, W.: A three-state model of the benzodiazepine receptor explains the interactions between the benzodiazepine antagonist Ro 15-1788, benzodiazepine tranquilizers, ß-carbolines, and phenobarbitone. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 321: 260-264 (1982)

Richards, J.G., Möhler, H.: Benzodiazepine receptors. Neuropharmacology 23: 233-242 (1984)

Rommelspacher, H., Bade, P., Coper, H., Kossmehl, G.: Inhibition of the reuptake of serotonin by tryptoline. Naunyn-Schmiedeberg`s Arch. Pharmacol. 292: 93-95 (1976)

Rommelspacher, H., Kauffmann, E., Heyck-Cohnitz, C., Coper, H.: Pharmacological properties of tetrahydronorharmane (tryptoline). Naunyn-Schmiedeberg`s Arch. Pharmacol. 298: 83-91 (1977)

Rommelspacher, H., Strauss, S., Rehse, K.: ß-carbolines: A tool for investigating structure activity relationships of the high affinity uptake of serotonin, noradrenaline, dopamine, GABA and choline into a synaptosome-rich fraction of various regions from rat brain. J. Neurochem. 30: 1573-1578 (1978)

Rommelspacher, H., Honecker, H., Barbey, M., Meinke, B.: 6-Hydroxy-tetrahydronorharmane (6-Hydroxy-tetrahydro-ß-carboline), a new active metabolite of indole-alkylamines in man and rat. Naunyn-Schmiedeberg`s Arch. Pharmacol. 310: 35-41 (1979)

Rommelspacher, H., Strauss, S., Lindemann, J.: Excretion of tetrahydroharmane and harmane into the urine of man and rat after a load with ethanol. FEBS Lett. 109: 209-212 (1980a)

Rommelspacher, H., Nanz, C., Borbe, H.O., Fehske, K.H., Müller, W.E., Wollert, U.: 1-methyl-ß-carboline (harmane) a potent endogenous inhibitor of benzodiazepine receptor binding. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 314: 97-100 (1980b)

Rommelspacher, H., Nanz, C., Borbe, H.O., Fehske, K.H., Müller, W.E., Wollert, U.: Benzodiazepine antagonism by harmane and other ß-carbolines in vitro and in vivo. Eur. J. Pharmacol. 70: 409-416 (1981)

Rommelspacher, H., Drüning, G.: Formation and function of tetrahydro-ß-carbolines with special reference to their action on ^{3}H tryptamine binding sites. In: Schlossberger, H.G., Kochen, W., Linzen, B., Steinhart, H.: Progress in tryptophan and serotonin research. de Gruyter Berlin, N.Y., pp. 209 (1984)

Rommelspacher, H., Nick, M., Drüning, G., Susilo, R., Hill, R.: Pharmacology of harmalane (1-methyl-3,4-dihydro-ß-carboline). Eur. J. Pharmacol., eingereicht (1984)

Scatchard, G.: The attractions of proteins to small molecules and ions. Ann. NY Acad. Sci. 51: 660-672 (1949)

Saano, V., Airaksinen, M.M.: Binding of ß-carbolines and caffeine on benzodiazepine receptors: correlations to convulsions and tremor. Acta Pharmacol. Toxicol. 51: 300-308 (1982)

Schultes, R.E., Hofmann, A.: The botany and chemistry of hallucinogens. C.C. Thomas Publ. Springfield, III, USA (1980)

Shoemaker, D.W., Cummins, J.T., Bidder, T.G.: ß-carbolines in rat arcuate nucleus. Neurosci. 3: 223-239 (1978)

Sigg, E.B., Gyermek, L., Hill, R.T., Yen, H.C.Y.: Neuropharmacology of some harmane derivates. Arch. Int. Pharmacodyn. 149: 164-180 (1964)

Späth, E., Lederer, E.: Synthese der Harmala-Alkaloide. Chem. Ber. 63: 120 (1930)

Squires, R.F., Braestrup, C.: Benzodiazepine receptors in rat brain. Nature 266: 732 (1977)

Susilo, R.: Biosynthesis of ß-carbolines in rat brain. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 325: R76 (1984)

Tallman, J.F., Thomas, J.W., Gallager, D.W.: GABA-ergic modulation of benzodiazepine binding site sensitivity. Nature 274: 384-385 (1978)

Tedeschi, D.H., Tedeschi, R.E., Fellows, E.J.: The effects of tryptamine on the central nervous system including a pharmacological procedure for the evaluation of iproniazid-like drugs. J. Pharmacol. Exp. Ther. 126: 223-232 (1959)

Winter, J.C., Gessner, P.K.: Phenoxybenzamine antagonism of tryptamines, their indene isosteres and 5-hydroxytryptamine in the rat stomach fundus preparation. J. Pharmacol. Exp. Ther. 162: 286-293 (1968)

Woolley, D.W., Shaw, E.: Antimetabolites of serotonin. J. Biol. Chem. 203: 69-79 (1953)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. H. Coper danke ich für seine bereitwillige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. med. H. Rommelspacher danke ich für seine ständige Hilfsbereitschaft bei der Durchführung dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Institutes danke ich für ihr kooperatives, hilfreiches Entgegenkommen.

Darüberhinaus möchte ich Herrn Prof. Dr. med. D. Palm, Frankfurt/Main, danksagen, der mich bei den ersten Schritten auf dem Wege zum Medizinstudium und wissenschaftlichem Arbeiten außerordentlich gefördert hat.

Lebenslauf

Am 2. 6. 1948 als Tochter des Polizeibeamten Josef Nick und seiner Ehefrau Maria, geb. Passens, in Kerken geboren.

Besuch der Hubertus-Volksschule in Kevelaer

1965 Mittlere Reife in Kevelaer (Kardinal von Galen Gymnasium)

1967 Apothekenhelferinnenbrief (Geldern)

Berufstätigkeit als Apothekenhelferin (Geldern, Ruit a.F.)

Ausbildung zur Pharmazeutisch-Technischen-Assistentin (Köln)

1973 Abschlußprüfung (Köln)

Berufstätigkeit als Pharmazeutisch-Technische-Assistentin (Apotheke u. Zentrum d. Pharmakologie des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/M.)

1976 Erwerb der Zulassung zum Hochschulstudium ohne Reifezeugnis (Frankfurt/M.)

1976 Beginn des Medizinstudiums (Marburg)

1983 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Marburg/Kassel)

1983 Beginn der Dissertation am Institut für Neuropsychopharmakologie (Berlin)

1984 Beginn der Berufstätigkeit als Ärztin im Krankenhaus Am Urban (Berlin)

Papyrus-Druck GmbH Berlin ☏ 3416451
Dissertationen